

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA DE OLIVEIRA

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO GIBERÉLICO POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA E POR
FERMENTAÇÃO NO ESTADO SEMISSÓLIDO EM DIFERENTES MODELOS DE
BIORREATORES UTILIZANDO POLPA CÍTRICA**

CURITIBA

2012

JULIANA DE OLIVEIRA

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO GIBERÉLICO POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA E POR
FERMENTAÇÃO NO ESTADO SEMISSÓLIDO EM DIFERENTES MODELOS DE
BIORREATORES UTILIZANDO POLPA CÍTRICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Área de Concentração em Agroindústria e Biocombustíveis, Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora:

Profa. Dra. Luciana Porto Souza Vandenberghe

Co-orientadores:

Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

Dra. Cristine Rodrigues

CURITIBA

2012

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e proteção.

Ao professor Dr. Carlos Ricardo Soccol pela oportunidade de cursar a graduação e a pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia e pela co-orientação.

A professora Dra. Luciana Porto de Souza Vandenberghe pela dedicação e orientação no trabalho e profissional.

A Dra. Cristine Rodrigues pela co-orientação científica e dedicação.

A Cristina Maria Monteiro Machado que aceitou participar da banca de avaliação deste trabalho e dar sugestões para o aprimoramento do mesmo.

Aos bolsistas de iniciação tecnológica Felipe Cintra, Thaisa Scheuer, Natália Dalibera e Letícia pela ajuda na realização do trabalho.

Aos amigos e colegas Mitiyo, Michelle, Mara, Maria, Denise, Pamela, Suzan, André, Mário, Valesca, Francieli, Gustavo, Joana e Sidnei pela ajuda, descontração e apoio em todos os momentos.

Aos colegas de trabalho, professores do Laboratório de Processos Biotecnológicos e Alex do LPH pela colaboração e auxílio.

A CAPES pelo auxílio financeiro e recursos materiais disponibilizados.

A UFPR e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos Biotecnologia pela estrutura necessária a realização deste trabalho.

A minha família pelo apoio emocional, pelas orações e todo o suporte.

Ao Scooby, Baby, Cacau e Luke pelo companheirismo.

A Mayara pelo amor, carinho, paciência e dedicação.

RESUMO

O ácido giberélico (GA_3) é um importante hormônio vegetal, pertencente à família das giberelinas. É um promotor e regulador de crescimento de plantas, que controla a germinação de sementes, atua no alongamento da parte aérea, induz a florescência, melhora o rendimento, entre outros. A produção de GA_3 não é realizada no Brasil sendo produzido apenas por grandes indústrias pelo processo de fermentação submersa, com altos custos o que limita sua aplicação em diversos cultivos. Este trabalho teve por objetivo produzir GA_3 por fermentação submersa (FSm) e fermentação no estado semissólido (FESS) utilizando como substratos subprodutos da agroindústria brasileira. Realizou-se uma seleção de cepas de fungos filamentosos quanto à produção de GA_3 em meio sintético *Imperial Chemical Industry* (ICI) por FSm. A maior produção de GA_3 obtida foi 248,3 mg/L com a cepa *Gibberella fujikuroi* LPB-06. Em seguida, foi realizada a seleção de um substrato alternativo para produção de GA_3 (extrato aquoso de polpa cítrica (EAPC), manipueira, melaço de cana, melaço de soja e vinhaça). O EAPC foi então escolhido e a produção de GA_3 foi de 150 mg/L (1,5 g de GA_3 /kg de polpa cítrica (PC) seca) em 120 horas de fermentação. Utilizando o EAPC, foram otimizadas algumas condições de fermentação tais como: taxa de inóculo, pH, quantidade de PC no extrato e nutrientes a serem adicionados ao EAPC. As maiores concentrações de GA_3 (320 mg/L ou 3,7 g de GA_3 /kg de PC seca) foram obtidas utilizando o EAPC 10% (10% de PC seca), pH 5,5 (natural da PC), 10% de taxa de inóculo e 0,5 g/L de $MgSO_4$. Na suspensão de PC (SPC) foram otimizadas a quantidade de PC e sua granulometria, assim como nutrientes para serem adicionados a SPC. A maior concentração de GA_3 obtida foi de 331 mg/L (7,7 g de GA_3 /kg de PC seca) utilizando 5% de PC na SPC, granulometria da PC de 2 a 2,8 mm, 20 g/L de sacarose e 0,6 g/L de uréia. A produção de GA_3 por FSm foi escalonada para biorreatores do tipo tanque agitado (STR) e biorreatores do tipo coluna de bolhas (BCB). Para STR foram utilizadas duas taxas de aeração diferentes (1 e 5 L/min) e duas velocidades de agitação (300 e 500 rpm). Para o BCB foram utilizadas três taxas de aeração diferentes (0,1, 0,5 e 1 L de ar/min). A melhor produção de GA_3 em STR foi de 273 mg/L (3,2 g de GA_3 /kg de PC seca) em 96 horas na condição de 500 rpm e 1 L de ar/min e, a melhor produção obtida por BCB foi de 203,1 mg/L (2,4 g de GA_3 /kg de PC seca) em 216 horas na condição de 1 L de ar/min. A FESS foi escalonada para biorreatores BCB e utilizaram-se três condições de aeração (0,1, 0,5 e 1 L de ar/min). A melhor produção de GA_3 , neste caso, foi de 207,7 mg/L (4,8 g de GA_3 /kg de PC seca) em 216 horas na condição de 1 L de ar/min. Os resultados apresentaram perspectivas de sequência dos estudos tais como: aumento de escala do processo de produção de GA_3 por FESS de frascos de Erlenmeyer para biorreator STR e estudo de diferentes modos de fermentação, melhoramento genético do fungo, estudos de processo de purificação do GA_3 , modelagem matemática do processo de produção de GA_3 , formulação de produtos a base de GA_3 , aplicação dos produtos em campo e estudo econômico dos custos de produção dos produtos obtidos.

Palavras-chave: Ácido giberélico, *Gibberella fujikuroi*, Fermentação submersa, Fermentação no estado semissólido, Polpa cítrica

ABSTRACT

Gibberellic acid (GA₃) is an important plant growth hormone, member of gibberellins family. It is a bioactive growth regulator that controls seed germination, act on stem elongation, induction of flowering, improvement of crop yield and among others things. GA₃ production is not performed in Brazil and has been produced only by large industries by submerged fermentation process, with high costs which limits its application in various cultivars. This study aimed the production of GA₃ by submerged fermentation (FSm) and semisolid fermentation (FESS) using as substrates, sub-products of the Brazilian agro industry. The screening of filamentous fungi strains was carried out, which involved the study of their capability to synthesize GA₃ production using of Imperial Chemical Industry (ICI) medium by submerged fermentation. *Gibberella fujikuroi* LPB-06 was the best GA₃ producer, reaching 248,3 mg/L. Then the screening of substrate (aqueous extract of citric pulp (AECp), manipueira, sugarcane molasses, soy molasses and vinasse), for GA₃ production was carried out. The AECp was chosen as substrate for the production of GA₃, and the production was 150 mg/L (1,5 g of GA₃/kg of dry CP) in 120 hours of fermentation. Some conditions such as: inoculum size, pH, CP amount in the aqueous extract and nutrients were optimized. The highest concentration of GA₃ obtained with AECp was 320 mg/L or 3,7 g of GA₃/kg of dry CP, with AECp 10% (10% of dry CP), pH 5,5, 10% of inoculums size and 0,5 g/L of MgSO₄. Using CP suspension (CPS), were optimized the amount of CP, particle size of substrate and nutrients that were added to medium. The highest GA₃ concentration obtained in FESS was 331 mg/L (7,7 g of GA₃/kg dry CP) using the medium composed by 5% (w/v) of CP particles, particle size of 2 to 2,8 mm, 20 g/L of sucrose and 0,6 g/L of urea. GA₃ production by FSm was performed in 10 L stirred tank reactor (STR) and 1,5 L bubble column reactor (BCR). For the STR, two different aeration rates (1 and 5 L of air/min) and two speed stirring (300 and 500 rpm) were used resulting in four fermentations. For the BCR, three different aeration rates (0,1, 0,5 and 1L of air/min) were employed. The higher GA₃ production obtained with AECp at STR was 273 mg/L (3,2 g of GA₃/kg of dry CP), after 96 hours of fermentation using 500 rpm and 1 L of air/min and, for BCR, the higher GA₃ production was 203,1 mg/L (2,4 g of GA₃/kg of dry CP) after 216 hours of fermentation, using 1 L of air/min. The FESS was carried out in BCR where three different aeration rates (0,1, 0,5 and 1L of air / min) were used. The GA₃ higher production, in this case, was 207,7 mg/L (4,8 g of GA₃/kg of dry CP), after 216 hours of fermentation using 1L of air/min. The results showed perspectives of sequence of the studies: scale up GA₃ production process by FESS from Erlenmeyer flask to STR and study of different techniques of fermentation, genetic improvement of strain, studies of purification process of GA₃, mathematic model of GA₃ production process, formulation of GA₃ products, application of products on cultivar fields e economics studies of production cost of products obtained.

Key words: Gibberellic acid, *Gibberella fujikuroi*, Submerged fermentation, Semisolid state fermentation, Citric pulp

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural do ent-giberelano.	19
Figura 2. Doença “bakanae”. A) semente infectada com <i>Fusarium moniliforme</i> . B) planta com características da doença.	20
Figura 3. Via biossintética de formação do <i>ent</i> -caureno em <i>Gibberella fujikuroi</i> . Adaptado de Tudzynski (1999).	22
Figura 4. Comparação da biossíntese de giberelinas em <i>Gibberella fujikuroi</i> e em plantas.	23
Figura 5. Estrutura química do ácido giberélico (GA ₃).	24
Figura 6. Conídios de <i>F. moniliforme</i> . A-B: macroconídios, C-D: microconídios.	31
Figura 7. Polpa cítrica peletizada.	32
Figura 8. Etapas de extração de GA ₃ do fermentado para análise.	51
Figura 9. Evolução da produção de GA ₃ , crescimento de biomassa, pH e consumo de açúcares por <i>G. fujikuroi</i> LPB-06.	55
Figura 10. Cinética de viabilidade celular em MS a 2 % e EAPC a 5 %.	59
Figura 11. Cinética de produção de GA ₃ em meio a base de MS a 2 % antes e depois do estudo de preparo do inóculo.	61
Figura 12. Cinética de produção de GA ₃ em meio à base de EAPC a 5 % antes e depois do estudo do preparo de inóculo.	62
Figura 13. Superfície de resposta gerada após planejamento experimental DCCR 2 ³ para as variáveis % de PC e pH.	76
Figura 14. Superfície de resposta gerada no planejamento experimental DCCR 2 ²	77
Figura 15. Diagrama de Pareto para o planejamento Plackett & Burman para seleção de sais a serem adicionados ao EAPC.	80
Figura 16. Produção de GA ₃ com diferentes concentrações de MgSO ₄ adicionados ao EAPC.	81
Figura 17. Cinética de produção de GA ₃ e crescimento da biomassa em frascos de Erlenmeyer em EAPC otimizado.	82
Figura 18. Cinética de aumento do pH e consumo de açúcares em frascos de Erlenmeyer em EAPC otimizado.	83
Figura 19. Superfície de resposta para o planejamento experimental DCCR (granulometria e quantidade de PC na SPC).	86

Figura 20. Diagrama de Pareto – Plackett & burman para seleção de nutrientes em FESS.....	87
Figura 21. Superfície de resposta para o planejamento DCCR 2 ² para otimização da concentração de sacarose e ureia em FESS.....	89
Figura 22. Estudo da cinética de crescimento da biomassa e produção de GA ₃ por FESS.....	91
Figura 23. Estudo da cinética de produção de GA ₃ e consumo de açúcares totais e redutores por FESS utilizando SPC.....	92
Figura 24. Biorreator tipo STR.....	97
Figura 25. A) Biorreator tipo coluna de bolhas projetado na DEBB. B) Projeto do BCB de 1,5 L com respectivas medidas.....	98
Figura 26. A) Fermentação de SPC em BCB. Condição de aeração 0,1 L de ar/min. B) Fermentação de SPC em BCB. Condição de aeração 1 L de ar/min	104
Figura 27. Fluxograma do processo de purificação do GA ₃ do caldo fermentação.	109
Figura 28. Análise por CLAE. À esquerda (A) está representado o cromatograma obtido do EF e à direita (B) está representado o cromatograma obtido do EC ...	111
Figura 29. Extrato fermentado (esquerda) e extrato clarificado (direita).	112
Figura 30. Análise de GA ₃ por CLAE. À esquerda (lado A) está apresentado o cromatograma do cristal obtido após a etapa de purificação e à direita (lado B) está apresentado o cromatograma do padrão de GA ₃ 99% de pureza da marca Sigma a 0,1 g/L ambos dissolvidos em etanol.	113
Figura 31. Cristais de GA ₃ obtidos após a purificação do extrato fermentado.	114

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Aplicações do GA ₃	25
Tabela 2. Produção de GA ₃ por FSm.....	27
Tabela 3. Produção de GA ₃ por FES	28
Tabela 4. Composição da polpa cítrica	32
Tabela 5. Composição da manipueira.....	33
Tabela 6. Composição do melaço de cana-de-açúcar	34
Tabela 7. Composição do melaço de soja	34
Tabela 8. Composição química da vinhaça de cana-de-açúcar proveniente do melaço	35
Tabela 9. Sais mineirais utilizados em fermentação para produção de GA ₃	37
Tabela 10. Extração e análise espectrofotométrica de GA ₃	41
Tabela 11. Metodologias de extração e análise de GA ₃ por CLAE	42
Tabela 12. Planejamento experimental para mistura de substratos.....	49
Tabela 13. Produção de GA ₃ e biomassa por diferentes cepas de <i>G. fujikuroi</i> e <i>F. moniliforme</i>	52
Tabela 14. Concentração de GA ₃ e biomassa com diferentes cepas de fungos isolados pertencentes ao banco de cepas LPB.	53
Tabela 15. Produção de GA ₃ por FSm em frascos de Erlenmeyer conforme a literatura	54
Tabela 16. Resultados da produção de GA ₃ em diferentes substratos utilizados neste trabalho.	56
Tabela 17. Quantidade de açúcares, nitrogênio e lipídios dos substratos estudados	58
Tabela 18. Planejamento experimental tipo DCCR 2 ³ para as variáveis taxa de inóculo, quantidade de PC e pH estudadas em FSm.....	67
Tabela 19. Planejamento experimental do tipo DCCR 2 ² para as variáveis pH e quantidade de PC no extrato estudadas em FSm.....	67
Tabela 20. Suplementação de fonte de carbono e de nitrogênio ao EAPC (<i>one factor at a time</i>) para a produção de GA ₃ por FSm	68
Tabela 21. Planejamento tipo Plackett & Burman para seleção de sais a serem adicionados ao EAPC	69

Tabela 22. Planejamento experimental (DCCR) para o estudo da influência das variáveis tamanho da partícula e quantidade de PC sobre a produção de GA ₃ em FESS.....	70
Tabela 23. Níveis e variáveis estudadas no planejamento estatístico (Plackett & Burman) para seleção de nutrientes a serem adicionados a SPC.....	71
Tabela 24. Planejamento experimental (DCCR) para otimização das concentrações de sacarose e ureia em FESS.	72
Tabela 25. Resultados do planejamento experimental DCCR para otimização das variáveis: taxa de inoculação, quantidade de PC no extrato e pH em FSm.....	74
Tabela 26. ANOVA dos resultados do planejamento experimental do tipo DCCR para as variáveis taxa de inoculação, pH e quantidade de PC em FSm.....	74
Tabela 27. Resultados do planejamento experimental DCCR 2 ² para as variáveis pH e quantidade de PC no extrato.....	76
Tabela 28. ANOVA dos resultados para o planejamento experimental DCCR 2 ² para as variáveis pH e quantidade de PC no extrato.	76
Tabela 29. Produção de GA ₃ com suplementação de fonte de carbono e fonte de nitrogênio ao EAPC.....	78
Tabela 30. Resultados do planejamento Plackett & Burman para seleção de nutrientes adicionados ao EAPC.....	79
Tabela 31. Resumo das etapas de otimização da produção de GA ₃ em EAPC.....	83
Tabela 32. Condições experimentais do planejamento DCCR para FESS	84
Tabela 33. ANOVA para o planejamento experimental DCCR (granulometria e concentração de PC) em FESS	85
Tabela 34. Resultados de produção de GA ₃ no planejamento Plackett & Burman para seleção de nutrientes em FESS.....	86
Tabela 35. Planejamento experimental DCCR 2 ² – Influência das variáveis sacarose e ureia sobre a produção de GA ₃ por FESS.	88
Tabela 36. ANOVA para a otimização da concentração de sacarose e uréia em FESS.....	89
Tabela 37. Resumo das etapas de otimização da produção de GA ₃ em FESS.....	92
Tabela 38. Combinações entre agitação e aeração para produção de GA ₃ em STR.	97
Tabela 39. Produção de GA ₃ obtida em diferentes condições de agitação e aeração por FSm em STR	100

Tabela 40. Crescimento de biomassa em diferentes condições de agitação e taxa de aeração em STR.....	101
Tabela 41. Produção de GA ₃ por FSm em BCB utilizando diferentes taxas de aeração	102
Tabela 42. Produção de GA ₃ por FESS em BCB utilizando diferentes taxas de aeração	103
Tabela 43. Produção de GA ₃ por FSm e FESS em diferentes tipos de biorreatores	104
Tabela 44. Concentração de GA ₃ por espectrofotometria no EF e no EC e porcentagem de recuperação do GA ₃	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABAM	Associação Brasileira de Produtores de Amido de Mandioca
AECP	Aqueous Extract Citric Pulp
Al	Alumínio
ANOVA	Análise de Variância
Aw	Atividade de Água
B	Boro
BCB	Biorreator Coluna de Bolhas
Ca	Cálcio
CLAE	Cromatografia de Alta Eficiência
CP	Citric Pulp
Cu	Cobre
CuSO ₄	Sulfato de Cobre
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EAPC	Extrato Aquoso de Polpa Cítrica
EC	Extrato Clarificado
EF	Extrato Fermentado
ESALQ/USP	Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo
Fe	Ferro
FES	Fermentação no Estado Sólido
FeSO ₄	Sulfato de Ferro
FESS	Fermentação no Estado Semissólido
FSm	Fermentação Submersa
GA	Giberelina
GA ₃	Ácido Giberélico
H ₃ PO ₄	Ácido Fosfórico
IAL	Instituto Adolfo Lutz
ICDCA	Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar
ICI	Imperial Chemistry Industries
K	Potássio
K ₂ HPO ₄	Fosfato de Potássio Dibásico
K ₂ SO ₄	Sulfato de Potássio
KCl	Cloreto de Potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de Potássio Monobásico
L	Interação Linear
LPB	Laboratório de Processos Biotecnológicos
LPH	Laboratório de Pesquisas Hidrogeológicas
m/v	Massa/Volume
MAN	Manipueira
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
MC	Melaço de Cana De Açúcar
Mg	Magnésio

MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
min	Minutos
Mn	Manganês
Mo	Molibdênio
MS	Melaço de Soja
N	Nitrogênio
Na	Sódio
NH ₄ NO ₃	Nitrato de Amônio
NH ₄ SO ₄	Sulfato de Amônio
P	Fósforo
PC	Polpa Cítrica
PDA	Potato Dextrose Agar
PIB	Produto Interno Bruto
ppm	partes por milhão
Q	Interação Quadrática
q.s.p.	quantidade suficiente para
rpm	rotações por minuto
S	Enxofre
SPC	Suspensão de Popa Cítrica
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/Volume
VIN	Vinhaça
vvm	volume de ar por volume de meio por minuto
Zn	Zinco
ZnSO ₄	Sulfato de Zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivo geral	17
2.2. Objetivos específicos	17
3. RELEVÂNCIA DO TRABALHO.....	18
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
4.1. As giberelinas.....	19
4.2. Histórico	20
4.3. Biossíntese das giberelinas.....	21
4.4. Interações	23
4.4.1. Interações com plantas	23
4.4.2. Interações com o microrganismo produtor.....	23
4.5. Ácido Giberélico (GA ₃)	24
4.5.1. Propriedades físicas e químicas do GA ₃	24
4.5.2. Aplicações do GA ₃	25
4.5.3. Processos de produção	26
Fermentação Submersa (FSm).....	26
Fermentação em superfície líquida.....	27
Fermentação no Estado Sólido (FES)	27
Fermentação no estado semissólido (FESS).....	28
Tanque agitado (Stirred Tank Reactor – STR).....	29
Coluna de bolhas	29
4.5.5. Microrganismos produtores de GA ₃	30
4.5.6. Substratos.....	31
Polpa Cítrica	31
Manipueira	33
Melaço de cana-de-açúcar	33
Melaço de soja.....	34
Vinhaça de cana de açúcar	35
4.6. Fatores que influenciam a produção de GA ₃	36
4.6.1. Fontes de Carbono	36
4.6.2. Nitrogênio.....	36
4.6.3. Sais minerais e elementos-traço.....	37
4.6.4. pH	37
4.6.5. Temperatura	38
4.6.6. Aeração.....	38
4.7. Purificação	38
4.8. Análise do GA ₃	40
4.8.1. Método espectrofotométrico.....	40
4.8.2. Análise fluorométrica	41
4.8.3. Análise espectrofluorodensitométrica	41
4.8.4. Cromatografia de camada delgada	41
4.8.5. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	42
4.8.6. Espectrometria de massa (EM).....	43
CAPÍTULO 1	44

SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS E SUBSTRATOS PARA A PRODUÇÃO DE GA₃ E ESTUDO DA PREPARAÇÃO DE INÓCULO DA LINHAGEM SELECIONADA	44
RESUMO.....	44
1. INTRODUÇÃO	44
2. MATERIAL E MÉTODOS	46
2.1. Microrganismos.....	46
2.2. Substratos.....	47
2.3. Seleção de cepas produtoras de GA ₃ por fermentação submersa	47
2.4. Cinética de produção de GA ₃ em meio ICI utilizando <i>Gibberella fujikuroi</i> LPB-06.....	48
2.5. Seleção de subprodutos da agroindústria como substrato para produção de GA ₃	49
2.6. Estudo do preparo de inóculo	50
2.6.1. Estudo da produção de GA ₃ com inóculo preparado em meio alternativo	50
2.7. Extração, análise de GA ₃ e biomassa total	51
2.8. Viabilidade celular	52
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
3.1. Seleção de cepas produtoras de GA ₃ por fermentação submersa	52
3.2. Estudo da cinética de produção de GA ₃ em meio ICI utilizando <i>G. fujikuroi</i> LPB-06.....	54
3.3. Seleção de subprodutos da agroindústria como substrato para produção de GA ₃	56
3.4. Estudo do preparo do inóculo	58
4. CONCLUSÃO	63
CAPÍTULO 2	64
OTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS FÍSICAS E QUÍMICAS DA PRODUÇÃO DE GA₃ POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA E NO ESTADO SEMISSÓLIDO UTILIZANDO POLPA CÍTRICA	64
RESUMO.....	64
1. INTRODUÇÃO	64
2. MATERIAL E MÉTODOS	65
2.1. Microrganismos.....	66
2.2. Substratos.....	66
2.3. Produção do Inóculo de <i>G. fujikuroi</i> LPB-06	66
2.4. Otimização das variáveis físicas e químicas em extrato aquoso de polpa cítrica (EAPC) para fermentação submersa.....	66
2.4.1. Otimização das variáveis físicas e químicas para produção de GA ₃ por fermentação submersa	67
2.4.2. Adição de nutrientes ao EAPC.....	68
2.4.2.1. Adição de fonte de carbono e fonte de nitrogênio suplementares no EAPC (one factor at a time).	68
2.4.2.2. Seleção de nutrientes adicionados ao EAPC.....	69
2.4.2.3. Determinação da melhor concentração de MgSO ₄ para produção de GA ₃	69

2.4.3. Cinética de produção de GA ₃ em EAPC utilizando Gibberella fujikuroi LPB-06.....	70
2.5. Otimização das variáveis físicas e químicas em FESS para a produção de GA ₃	70
2.5.1. Planejamento experimental para otimização do tamanho da partícula e quantidade de PC na SPC	70
2.5.2. Adição de nutrientes a SPC.....	71
2.5.2.1. Seleção de nutrientes adicionados a SPC.....	71
2.5.2.2. Otimização da concentração de sacarose e uréia adicionadas a SPC para produção de GA ₃	71
2.5.3. Cinética de produção de GA ₃ por FESS	72
2.6. Análises.....	72
2.7. Análise estatística	73
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
3.1. Otimização das variáveis físicas e químicas da produção de GA ₃ por fermentação submersa (FSm).....	73
3.1.1. Otimização das variáveis físicas e químicas para produção de GA ₃ por FSm	73
3.1.2. Adição de nutrientes ao EAPC.....	78
3.1.2.1. Suplementação de fonte de carbono e fonte de nitrogênio no EAPC (one factor at a time).....	78
3.1.2.2. Seleção de nutrientes adicionados ao EAPC.....	79
3.1.2.3. Determinação da melhor concentração de MgSO ₄ para produção de GA ₃	80
3.1.3. Estudo da cinética de produção de GA ₃ em EAPC utilizando Gibberella fujikuroi LPB-06.....	81
3.1.4. Produção de GA ₃ ao longo do processo de otimização	83
3.2. Otimização das variáveis físicas e químicas em fermentação no estado semissólido utilizando polpa cítrica (PC).....	84
3.2.1. Planejamento experimental para otimização do tamanho da partícula e quantidade de PC na suspensão de PC (SPC)	84
3.2.2. Adição de nutrientes a SPC na FESS.....	86
3.2.2.1. Seleção de nutrientes a serem adicionados a SPC	86
3.2.2.2. Otimização da concentração de sacarose e ureia para produção de GA ₃	88
3.2.3. Cinética de produção de GA ₃ por FESS	90
3.2.4. Produção de GA ₃ ao longo do processo de otimização em SPC	92
4. CONCLUSÃO	92
CAPÍTULO 3.....	94
PRODUÇÃO DE GA₃ POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA E FERMENTAÇÃO NO ESTADO SEMISSÓLIDO EM DIFERENTES BIORREACTORES: AGITADO E COLUNA DE BOLHAS.....	94
RESUMO.....	94
1. INTRODUÇÃO	94
2. MATERIAL E MÉTODOS	95
2.1. Microrganismos.....	95
2.2. Substratos	96

2.3. Produção do Inóculo de <i>G. fujikuroi</i> LPB-06	96
2.4. Aumento de escala da produção de GA ₃ por fermentação submersa para biorreator tipo tanque agitado	96
2.5. Produção de GA ₃ por fermentação submersa e fermentação no estado semissólido em biorreator tipo coluna de bolhas	98
2.5. Análises.....	99
3. RESULTADOS.....	99
3.1. Escalonamento da produção por FSm para biorreator STR.	99
3.2. Produção de GA ₃ por FSm em BCB	102
3.3. Produção de GA ₃ por FESS em biorreator BCB.	103
3.4. Desenvolvimento do processo de produção de GA ₃	104
4. CONCLUSÃO	105
CAPÍTULO 4.....	106
PURIFICAÇÃO DO GA₃ PRESENTE NO CALDO FERMENTADO DE POLPA CÍTRICA.....	106
RESUMO.....	106
1. INTRODUÇÃO	106
2. MATERIAL E MÉTODOS	108
2.1. Microrganismo.....	108
2.2. Substrato.....	108
2.3. Preparo do inóculo de <i>G. fujikuroi</i> LPB-06	108
2.4. Produção de GA ₃ por FESS.....	109
2.5. Purificação do GA ₃ e análise por CLAE	109
2.6. Análises.....	110
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	110
3.3. Análises do extrato fermentado e do extrato clarificado por CLAE	110
4. CONCLUSÃO	114
CONCLUSÕES GERAIS	115
PERSPECTIVAS.....	117
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118

1. INTRODUÇÃO

Os hormônios vegetais os quais incluem as citocininas, giberelinas, auxinas (ácido indolil acético) e etileno têm mostrado grande potencial no aumento da produtividade na agricultura (Rodrigues, 2010). Das giberelinas isoladas, o ácido giberélico (GA_3) tem recebido a maior atenção. O GA_3 regula a taxa de crescimento das plantas sendo extensivamente utilizado para produzir uma série de efeitos benéficos (Tudzynski, 1999; Shukla, Srivastava e Chand, 2003).

A produção de GA_3 não é realizada no Brasil e tem sido produzido pelo processo de fermentação submersa, com alto custo de produção que limita sua aplicação em diversos cultivares (Kumar e Lonsane, 1989). No Brasil, o GA_3 tem sido comercializado por R\$ 7,90 o grama (Brasil Defensivos, 2011).

A fermentação submersa (FSm) apresenta diversas vantagens, tais como facilidade operacional, economia, espaço reduzido e controle de parâmetros operacionais precisos (Machado, 2002). A produção de GA_3 por FSm é baixa e o produto diluído no meio fermentado apresenta maior dificuldade de recuperação e purificação (Jefferys, 1970; Kumar & Lonsane, 1989).

A fermentação no estado semissólido (FESS) é descrita como sendo a FES em um meio contendo líquido livre, o que permite uma melhor e mais fácil recuperação dos produtos solubilizados (Rodriguez Couto, Dominguez e Sanroman, 2001).

O Brasil mantém sua produção agropecuária entre as mais prósperas do planeta. A safra 2010/2011 levou o país a um novo recorde na produção de grãos: 161,5 milhões de toneladas, que representa 8,2% acima da safra anterior. As produções que tiveram maiores aumentos, em relação à safra anterior, foram: algodão (65,4%), uva (44,8%), café (38,4%), milho (29,3%), soja (17,4%), feijão (11%), mandioca (8,6%) e laranja (7%) (MAPA, 2012).

Os processos agrícolas geram resíduos os quais quando dispostos na natureza causam graves problemas ambientais. Uma alternativa para os resíduos gerados é a aplicação em processos fermentativos. Para viabilizar qualquer processo produtivo industrial é necessário utilizar matérias primas baratas e baixar os custos da produção, sem prejuízo à qualidade do produto final (Soccol e Vandenberghe, 2003).

A polpa cítrica (PC) é um subproduto da agroindústria de suco de frutas cítricas composta basicamente por cascas, sementes e bagaço de laranja. É utilizada como complemento para a ração animal, principalmente na pecuária (Alcance Pecuária, 2012). A PC tem sido utilizada em outros estudos realizados na divisão de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia e tem mostrado grande potencial como substrato para produção de diversos metabólitos. Rodrigues (2010) utilizou a PC como substrato/suporte para produção de GA₃ por fermentação no estado sólido (FES) e obteve uma produção de 7,6 g de GA₃/kg de PC seca.

A produção de GA₃ por FES mostrou-se interessante do ponto de vista da produção. No entanto, a técnica de FES ainda é de difícil escalonamento. Daí a importância da avaliação de técnicas de fermentação que propiciem o escalonamento do processo e, ao mesmo tempo, viáveis economicamente. No presente trabalho foi realizada a comparação da produção de GA₃ por cepas de *Gibberella fujikuroi* utilizando subprodutos da agroindústria brasileira utilizando duas técnicas de fermentação, a submersa e fermentação no estado semissólido. Os ensaios foram realizados na escala laboratorial em frascos de Erlenmeyer e em biorreatores do tipo tanque agitado (STR) e biorreatores tipo coluna de bolhas (BCB).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O trabalho teve por objetivo comparar a produção de GA₃ por cepas de *Gibberella fujikuroi* utilizando subprodutos da agroindústria brasileira utilizando duas técnicas de fermentação, a submersa e a fermentação no estado semissólido.

2.2. Objetivos específicos

1. Selecionar cepas de *Gibberella fujikuroi*, de *Fusarium moniliforme* e demais cepas isoladas - provenientes do banco de cepas do Laboratório de Processos Biotecnológicos I – LPB-I da Divisão de Engenharia de Bioprocessos da UFPR - para a produção de GA₃.
2. Selecionar substratos alternativos dentre subprodutos da agroindústria, para a produção de GA₃.
3. Otimizar as condições físicas e químicas da produção de GA₃ por fermentação submersa em frascos de Erlenmeyer.
4. Otimizar as condições físicas e químicas em frascos de Erlenmeyer para a produção de GA₃ por fermentação no estado semissólido.
5. Estudar a produção de GA₃ por fermentação submersa em biorreatores tipo tanque agitado, nas condições otimizadas.
6. Estudar a produção de GA₃ por fermentação submersa e fermentação no estado semissólido em biorreatores tipo coluna de bolha, nas condições otimizadas.
7. Comparar a produção de GA₃ nas diferentes técnicas de fermentação em termos da concentração, produtividade e variáveis operacionais.

3. RELEVÂNCIA DO TRABALHO

Este trabalho dá continuidade a outros realizados anteriormente na Divisão de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR. Machado (2002) demonstrou que com um substrato misto constituído de casca de café e bagaço de mandioca, a produção de GA_3 é viável por FES utilizando-se o fungo *Gibberella fujikuroi* LPB-06, o qual atingiu 1,19 g/kg cascas de café secas. Rodrigues (2010) utilizou PC para a produção de GA_3 por FES tendo obtido uma produção de 7,6 g/kg de PC seca, utilizando a cepa de *Fusarium moniliforme* LPB-03.

A produção de GA_3 obtida com a utilização de PC foi superior à produção obtida com a utilização de casca de café e bagaço de mandioca. Desta forma, justifica-se o estudo da produção, purificação e aplicação de ácido giberélico (GA_3) utilizando polpa cítrica como substrato, empregando-se outras técnicas de fermentação que possam ser mais facilmente transferidas ao setor produtivo. Este é o caso da fermentação submersa (FSm) e da fermentação no estado semissólido (FESS).

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. As giberelinas

As giberelinas (GAs) constituem uma grande família de ácidos dipentenóides, representando um grupo importante de fitohormônios que exercem diversos efeitos sobre o crescimento e desenvolvimento de plantas, tais como germinação, expansão das folhas, desenvolvimento das flores. Assim como as auxinas, estimulam a atividade de transferência causando maior formação de xilema e floema em plantas lenhosas (Tudzynski, 1999; Buchanan, Grissem e Jones, 2000; Tucker e Roberts, 2000; Davies, 2004). Atualmente, 136 giberelinas são conhecidas, as quais foram identificadas em plantas, fungos e bactérias, e são conhecidas como GA₁ até GA₁₃₆, segundo a ordem de descoberta (Bömke e Tudzynski, 2009).

Todas as giberelinas possuem um esqueleto estrutural conhecido como ent-giberelano (Figura 1). Podem ter 19 ou 20 unidades de carbono os quais podem formar quatro ou cinco sistemas de anéis. Todas as giberelinas bioativas possuem 19 carbonos, entretanto nem todas as giberelinas que possuem 19 carbonos são bioativas (Bömke e Tudzynski, 2009).

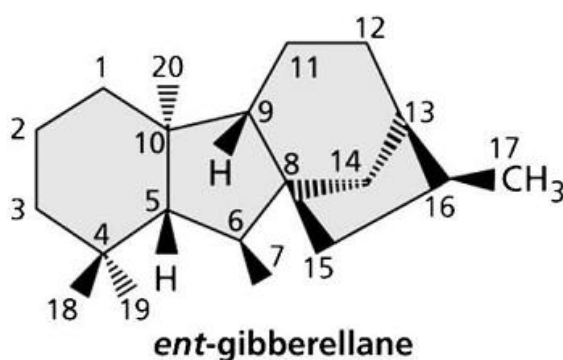


Figura 1. Fórmula estrutural do ent-giberelano.

FONTE: Bömke e Tudzynski (2009).

Das giberelinas isoladas, o ácido giberélico (GA₃) tem recebido a maior atenção. O GA₃ regula a taxa de crescimento das plantas sendo extensivamente utilizado para produzir uma série de efeitos benéficos. Tais propriedades tornaram as giberelinas uma ferramenta valiosa na agricultura (Machado, 2002).

4.2. Histórico

Nos primeiros relatos publicados, as giberelinas não foram identificadas como hormônios de plantas e sim como metabólitos de um fungo do gênero *Fusarium*, o qual é patogênico do arroz. A doença era conhecida como “bakanae”, ou “doença da plantinha boba”. As plantas doentes tornam-se mais delgadas e longas e com uma cor amarelada nas partes afetadas (Figura 2). Após um crescimento muito rápido, as plantas infectadas morrem.

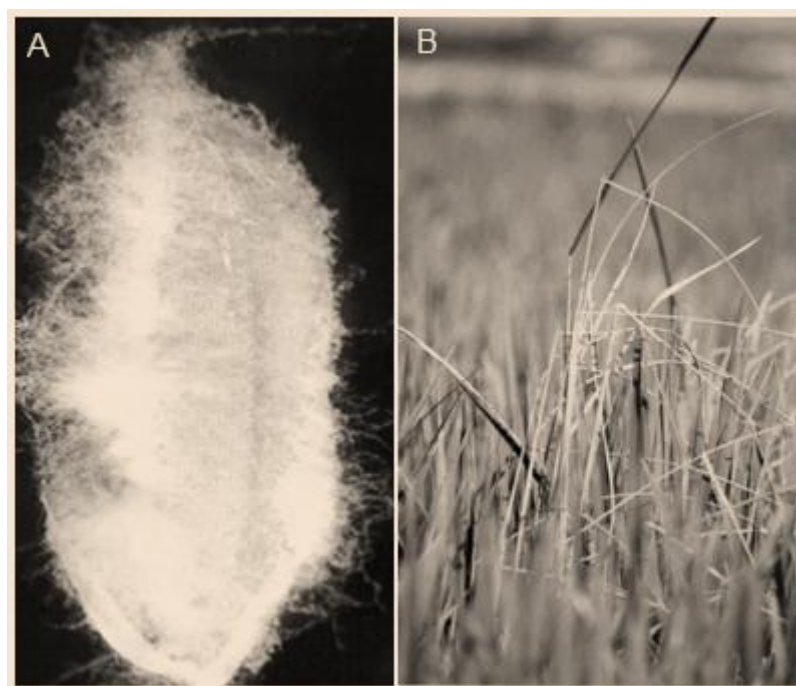


Figura 2. Doença “bakanae”. A) semente infectada com *Fusarium moniliforme*. B) planta com características da doença.

FONTE: knowledgebank (2012).

Em 1917, o fungo *Gibberella fujikuroi* foi descrito como *Lisea fujikuroi* e identificado como o causador da doença “bakanae”, ou “doença da plantinha boba”. Em 1926, o pesquisador japonês Eiichi Kurosawa descobriu que a doença era causada por uma substância secretada pelo fungo patógeno, um sólido que foi chamado de giberelina A. Em 1931 o fungo foi redefinido como *Gibberella fujikuroi* (Bömke e Tudzynski, 2009).

Entre 1927 e 1940, houve mais de 50 publicações relativas às propriedades químicas e biológicas da substância descoberta por Kurosawa. Em 1938, os pesquisadores Yabuta e Sumiki cristalizaram dois compostos chamados de

“giberelinas A e B”. Ambas as substâncias eram biologicamente ativas, mas tinham propriedades químicas diferentes (Metivier, 1979; Takahashi, 1986).

Após a 2ª guerra mundial, iniciou-se uma nova fase de pesquisas, as quais chamaram atenção de outros países como Estados Unidos da América e Grã-Bretanha (Metivier, 1979; Takahashi, 1986). Em 1955, Takahashi *et al.* realizaram a separação da giberelina A em três componentes, conhecidos como A₁, A₂ e A₃ (Bomke e Tudzynski, 2009). Nesta mesma década, a empresa inglesa Imperial Chemical Industry (ICI) iniciou suas pesquisas na área de fermentação e, após várias etapas de purificação, uma giberelina foi isolada e chamada de “ácido giberélico”, com fórmula molecular C₁₉H₂₂O₆ e estrutura idêntica à da giberelina A₃ (Takahashi, 1986).

As giberelinas começaram a ser aplicadas na agricultura no início dos anos 50. Inicialmente, fermentações em escala de laboratório com *G. fujikuroi* foram conduzidas pela ICI, provendo pequenas quantidades de giberelinas para cientistas ao redor do mundo. O interesse pela produção de giberelinas aumentou consideravelmente, e laboratórios como Abbott, Merck, Eli Lilly e Pfizer nos EUA e *Takeda Chemical Industries* no Japão, tiveram licença de fabricação do produto, concedida pela ICI (Metivier, 1979; Takahashi, 1986).

4.3. Biossíntese das giberelinas

O estudo da biossíntese das giberelinas (GAs) foi iniciado primeiramente em fungos. Nos anos de 1960 e início de 1970, a biossíntese do ácido giberélico no fungo *Fusarium fujikuroi* foi determinada através da incorporação de acetato e mevalonato com carbono marcado. O isolamento de intermediários da via biossintética foi realizada utilizando um fungo mutante. O estudo da biossíntese de GAs em plantas superiores iniciou muito tempo depois (Bomke e Tudzynski, 2009).

A descoberta dos genes que codificam as enzimas da biossíntese de GAs em plantas e fungos demonstrou que a rota de biossíntese de GAs é diferente entre eles em níveis químicos, enzimáticos e genéticos (Yamaguchi, 2008; Bomke e Tudzynski, 2009).

As giberelinas são sintetizadas a partir do acetil-CoA pela via do ácido mevalônico (via MVA), o qual é produzido pela condensação de três moléculas da acetil coenzima A (CoA). O MVA é então convertido via isopentenil, dimetilalil, geranil e difosfato de farnesila em difosfato de geranil geranila (GDPP) (Tudzynski,

1999). As enzimas *ent*-copalil difosfato sintase (CPS) e *ent*-caureno sintase (KS) estão envolvidas na conversão do GDPP para o *ent*-caureno (Figura 3) (Yamagushi, 2008).

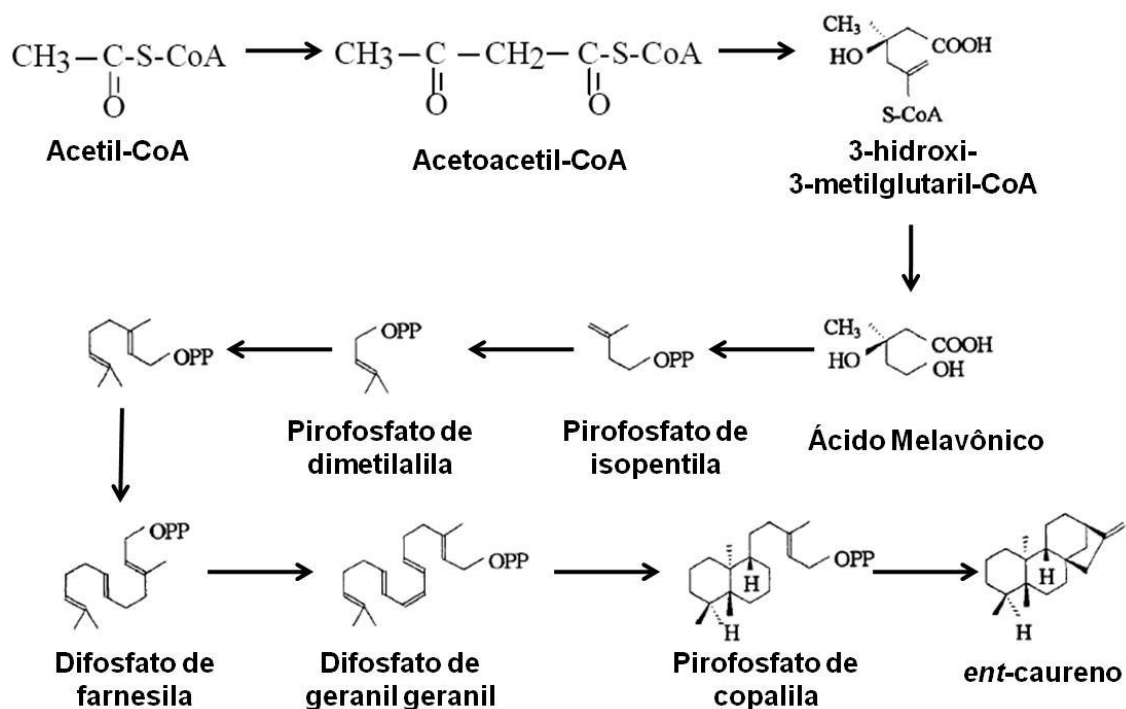


Figura 3. Via biossintética de formação do *ent*-caureno em *Gibberella fujikuroi*. Adaptado de Tudzynski (1999).

O *ent*-caureno sofre modificações sucessivas pelas citocromo P-450 oxigenases (P450) até formar o GA₁₂-aldeído (Tudzynski, 1999; Yamagushi, 2008).

Todas as etapas da rota biossintética, até a formação GA₁₂-aldeído, são idênticas em plantas e fungos. A partir do GA₁₂-aldeído, as vias de biossíntese de giberelinas são diferentes em fungos e em plantas. Em muitas espécies de plantas, o GA₁₂-aldeído é convertido em GA₁₂ e então oxidado para formar a giberelina GA₉ ou 13-hidroxilado para formar GA₅₃. A etapa final da via de formação de giberelinas em plantas, GA₉ e GA₅₃, formam GA₄ e GA₁, respectivamente. Em fungos, GA₁₂-aldeído é 3b-hidroxilado a GA₁₄-aldeído, o qual é oxidado para formar GA₁₄. O GA₁₄ sofre oxidação para formar o GA₄. Uma dessaturação ocorre no GA₄ resultando na formação do GA₇, o qual é convertido por hidroxilação em GA₃. O GA₁ é formado a partir do GA₄ (Figura 4) (Yamagushi, 2008; Bomke e Tudzynski, 2009).

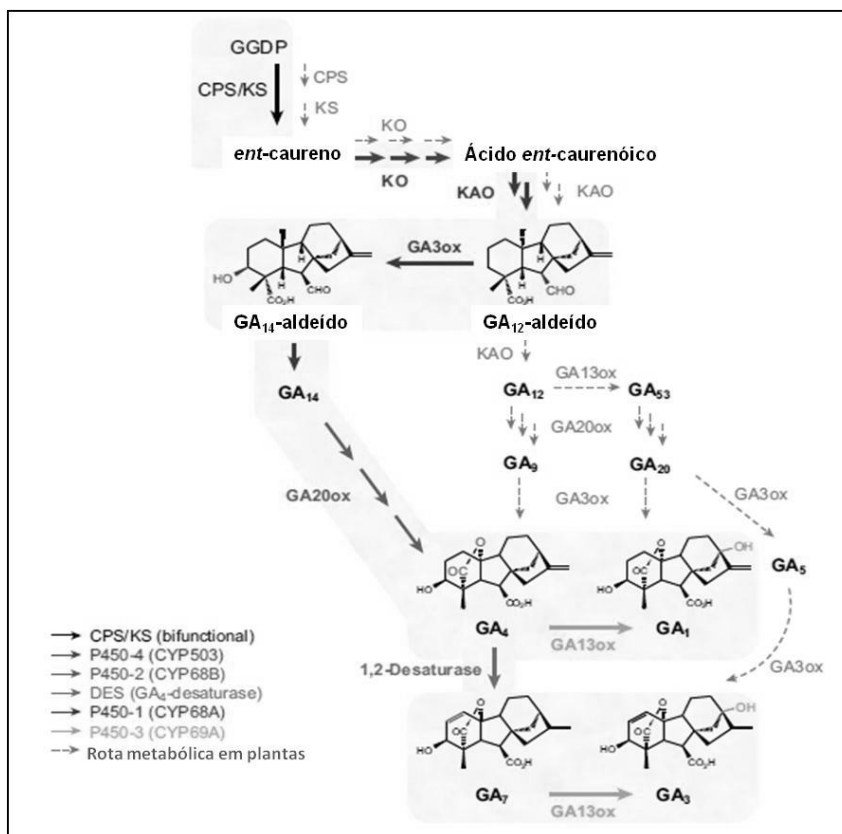


Figura 4. Comparação da biossíntese de giberelinas em *Gibberella fujikuroi* e em plantas.

FONTE: (Yamagushi, 2008).

4.4. Interações

4.4.1. Interações com plantas

Nas plantas, a quantidade de giberelinas (GAs) varia de 0,001 a 1,0 mg por kg de peso fresco. Diferentes GAs podem ser encontradas na mesma planta e a proporção entre elas pode mudar dependendo do estágio de desenvolvimento. Os efeitos causados pelas giberelinas dependem do gênero, órgãos e estágio de desenvolvimento da planta. As giberelinas interagem com outros hormônios reguladores de crescimento tais como auxinas, citocininas e ácido abscísico (Takahashi, 1986; Brückner & Blechschmidt, 1991; citado por Machado, 2002).

4.4.2. Interações com o microrganismo produtor

O fungo *G. fujikuroi* produz grandes quantidades de GA₃ e algumas outras giberelinas, se comparado com a quantidade existente em plantas superiores. Alguns pesquisadores acreditam que as giberelinas não têm nenhuma ação

regulatória de crescimento nos microrganismos. Entretanto, cientistas japoneses encontraram estímulo na germinação de esporos e alongamento das hifas pela ação do GA₃, afirmando desta forma, que a função deste metabólito é a mesma nos fungos que nas plantas (Brückner & Blechschmidt, 1991; citado por Machado, 2002; Leslie e Summerell, 2006).

4.5. Ácido Giberélico (GA₃)

4.5.1. Propriedades físicas e químicas do GA₃

O GA₃ é um sólido cristalino, de fórmula molecular C₁₉H₂₂O₆, de massa molecular 346,37 g/mol e de ponto de fusão: 233 - 235 °C (O'Neil, 2001). Não possui odor, sua densidade é de 600 mg/ml a 28 °C e pH 4,0 (Pesticide Registration Status, 2012).

O GA₃ é ligeiramente solúvel em éter dietílico. É solúvel em etanol, metanol, acetona, solução de bicarbonato de sódio, solução de acetato de sódio e soluções alcalinas. É moderadamente solúvel em acetato de etila e insolúvel em clorofórmio. Em água, a solubilidade do GA₃ é de 5000 mg/L a 25 °C (National Library of medicine HDSB database, 2012).

É quimicamente caracterizado como um ácido tetracíclico dihidroxi-g-lactônico, contendo duas ligações duplas carbono-carbono e uma carboxila livre (Figura 5). Sua estrutura foi obtida pelo estudo da decomposição de produtos ácidos e sua estereoquímica absoluta foi deduzida de dispersão rotatória, dicroísmo circular e análises de raios-X. Ele produz uma coloração azul intensa e forte fluorescência azulada após reação com ácido sulfúrico (Kumar & Lonsane, 1989).

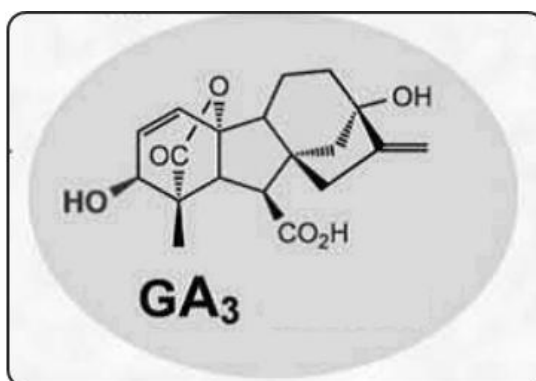


Figura 5. Estrutura química do ácido giberélico (GA₃).

FONTE: Bömke e Tudzynski, (2009).

4.5.2. Aplicações do GA₃

O GA₃ controla muitos processos em plantas como a indução da atividade de enzimas hidrolíticas (De Malach, Sachs e Rotem, 1976; Foury, 1977; Zaki *et al.*, 1991; Schrader, 1994; Miguel *et al.*, 1997; Garcia *et al.*, 1999; Crow, Thomson e Mander, 2006).

Os efeitos do tratamento com GA₃ antes da colheita, os quais controlam a deterioração do fruto, têm sido estudados (Eschel *et al.*, 2000; Kinay *et al.*, 2005). O tratamento de frutos com GA₃ após a colheita atrasa seu amadurecimento (Baldwin, 2003; Ludford, 2003). Durante o período do outono, o tratamento de plantas cítricas com GA₃ reduz a florescência em 50%, dependendo da concentração usada (Monselise e Halevy, 1964; El-Otmani *et al.*, 2000). A mesma observação foi feita para a produção de damascos entre os meses de maio e julho (Southwick, Yeager e Zhou, 1995). Para a produção de pêssegos, foram obtidos resultados similares e também foi mostrado que a resposta depende da data do tratamento e quantidade do hormônio aplicado por árvore (Painter e Stembridge, 1972; Taylor e Geisler-Taylor, 1998; Baviera *et al.*, 2002).

Gonzalez-Rossia *et al.* (2006) observaram a redução do número de flores/cm em 31-43 % dos cultivos de ameixas japonesas. A combinação de 20 mM de Ca⁺² com 10⁻⁶ M de GA₃, para a produção de fava (planta da família das leguminosas), aumentou o tamanho da planta, tamanho da raiz, peso seco e úmido da raiz, número de raízes, quantidade relativa de água e clorofila, antocianina e atividade da enzima carbonica anidrase (Al-Whaibi *et al.*, 2010). Outras aplicações do GA₃ são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Aplicações do GA₃

Aplicação	Efeito	Referência
Efeito do GA ₃ e CaCl ₂ em linhaça	Aumento do tamanho da planta, número de folhas, área da folha, peso seco e úmido da planta	Khan <i>et al.</i> , 2010
Influencia nos parâmetros vegetativos de morangos 'Chandler'	Altura e espalhamento da planta, comprimento do pistilo, número de folhas e área das folhas	Sharma e Singh, 2009
Efeito na polinização de tangerina Clementine para obtenção de frutos sem sementes	Prejudica a fertilização por ter ação na ovulação e na polinização sob condições de polinização cruzada	Mesejo <i>et al.</i> , 2008
Sementes de ervilha	Estimulo do crescimento dos brotos	Baumgartner <i>et al.</i> , 2008
Pêssegos e nectarina	Inibição da floração	Gonzalez-Rossia <i>et al.</i> , 2007

Aplicação	Efeito	Referência
Sementes de <i>Trichocereus terscheckii</i>	Promoção da germinação com e sem luz	Ortega-Baes e Rojas-Arechiga, 2007
Cultivo da batata	Promoção da multiplicação e alongamento celular, quebra da dormência	Alexopoulos <i>et al.</i> , 2007
Frutos de lichia “Yu Her Pau”	Aumento da massa da fruta	Chang e Lin, 2006
Passiflora nítida Khunt	Efeito sobre a germinação – quebra de dormência	Passos <i>et al.</i> , 2004
Maturação de caqui “Fuyiu”	Retardamento da maturação	Ferri <i>et al.</i> , 2004
Uvas do cultivar Niagara Rosada	Aumento da massa e do número de bagos, diminuição do número de sementes	Botelho, Pires e Terra, 2003
Efeito sobre o florescimento de crisântemo	Antecipação do florescimento	Schmidt <i>et al.</i> , 2003
Frutos de lima ácida “Tahiti”	Efeito sobre a floração e fixação dos frutos	Serciloto e Castro, 2001
Conservação pós-colheita de lima ácida “Tahiti”	Manutenção da cor verde da casca	Biasi e Zanette, 2000
Infecção das folhas de batatas por <i>P.infestans</i>	Inibição dos esporangiosporos do parasita	Kumar e Lonsane, 1989
Cana-de-açúcar	Melhora na produtividade	Kumar e Lonsane, 1989
<i>Bacillus subtilis</i>	Aumento da produção de alfaamilase	Takahashi, 1986

4.5.3. Processos de produção

O GA₃ pode ser obtido através da síntese química, extração de plantas e fermentação. Os métodos de síntese química e extração de plantas não se mostram economicamente viáveis pelo baixo rendimento. Industrialmente, a produção de GA₃ é realizada através da fermentação submersa (Rodrigues *et al.*, 2011).

Outros processos fermentativos têm sido estudados para aumentar a produção de GA₃. Dentre os processos fermentativos alternativos, pode-se citar a fermentação em superfície líquida, a fermentação no estado sólido (FES) e a fermentação no estado semissólido (FESS). Não há relatos de produção de GA₃ por FESS.

Fermentação Submersa (FSm)

Na fermentação submersa, o meio líquido é empregado em vasos cilíndricos de proporções altura: diâmetro de 2:1 e 3:1. Na maioria dos casos, todos os nutrientes estão dissolvidos na água. A FSm apresenta diversas vantagens, tais como facilidade operacional, economia, facilidade no controle de parâmetros operacionais e exige um menor espaço (Kumar & Lonsane, 1989).

A produção de GA₃ por FSm é baixa. Em 1979, demonstrou-se que este processo de fermentação estava muito próximo da saturação, ou seja, a redução de

custo tornar-se impossível. O produto diluído no meio fermentado é dito como o maior obstáculo no processo de produção, devido às dificuldades geradas no processo de recuperação e purificação (Jefferys, 1970; Kumar & Lonsane, 1989).

Estudos da produção de GA₃ por FSm são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Produção de GA₃ por FSm.

Substrato	Método utilizado	Produção	Referência
Glicose, água de maceração de milho, NH ₄ SO ₄ , KH ₂ PO ₄ e K ₂ SO ₄	Produção em batelada alimentada	0,66 g/L	Berrios, Pyle e Aroca, 2010
Farinha de arroz, glicose, NH ₄ NO ₃ , MgSO ₄ ·7H ₂ O e KH ₂ PO ₄	Produção em batelada alimentada	1,0 g/L	Shukla, Chand e Srivastava, 2005
Farinha de arroz, glicose, NH ₄ NO ₃ , MgSO ₄ ·7H ₂ O e KH ₂ PO ₄	Produção em batelada	1,68 g/L	Shukla, Chand e Srivastava, 2005
Meio quimicamente definido contendo glicose	Produção em batelada com biorreator do tipo air-lift	100 ppm	Chavez-Parga <i>et al.</i> , 2008
40 g/L de sacarose	Produção em batelada em fermentador de 30 L com aeração.	0,2 g/L	Borrow <i>et al.</i> , 1964

Fermentação em superfície líquida

A fermentação em superfície líquida envolve o crescimento de microorganismos na superfície de um meio líquido (Lekha e Lonsane, 1994).

As primeiras tentativas de produção de giberelinas foram realizadas no Japão, baseadas na técnica de fermentação de superfície, resultando em concentrações de 40 a 60 mg/L de GA₃ (Tudzynski, 1999). A fermentação em superfície líquida apresenta vantagens tais como a não formação de espuma e a não destruição mecânica do micélio, em comparação à FSm. Entretanto, devido às desvantagens tais como a necessidade de grandes espaços, processo trabalhoso, prolongado período de incubação, facilidade de contaminação, não uniformidade de crescimento, entre outras, levaram ao abandono desta técnica por volta de 1955 (Kumar & Lonsane, 1989).

Fermentação no Estado Sólido (FES)

A FES é caracterizada pelo desenvolvimento do microrganismo em um ambiente com baixa atividade de água, sobre e no interior de partículas porosas úmidas denominadas suporte ou matriz sólida. Esta matriz sólida não solúvel pode

atuar tanto como suporte físico quanto como fonte de nutrientes (Pandey, 2003; Singhania *et al.*, 2009).

A técnica de FES tem mostrado várias vantagens sobre o processo de FSm na produção de biomassa microbiana e metabólitos agregando valor a subprodutos da agroindústria (Pandey, 1992; Soccol, 1996; Pandey *et al.*, 2001; Soccol e Vandenberghe, 2003; Soccol *et al.*, 2006). Algumas vantagens da FES: condições da cultura em FES próximas às que se desenvolvem em meios naturais; simplicidade no preparo do meio de cultura; diminuição de contaminações; redução dos efluentes líquidos a tratar; resíduos sólidos mais estáveis após a fermentação; produção concentrada de metabólitos e a eliminação da formação de espuma (Soccol, 1994; Soccol e Vandenberghe, 2003).

A Tabela 3 apresenta produções de GA₃ por FES utilizando diferentes substratos/suportes.

Tabela 3. Produção de GA₃ por FES

Substrato/Suporte	Produção	Referência
Polpa cítrica	5,9 g/kg	Rodrigues <i>et al.</i> , 2009
Farelo de trigo e amido solúvel	4,5-5 g/kg	Corona, Sanchez e Agostín, 2005
Casca de café e bagaço de mandioca	492,5 mg/kg	Machado, 2002
Casca de café	100 mg/kg	Machado <i>et al.</i> , 2001
Meio sintético	0,73 mg/g	Gelmi <i>et al.</i> , 2000
Bagaço de mandioca	250 mg/kg	Tomasini, Fajardo e Barrios-González, 1997
Farelo de trigo	3 g/Kg	Bandelier <i>et al.</i> , 1997
Resíduo do processamento do mexilhão (MPW)/ Sabugo de milho	3,8 g/Kg	Pastrana <i>et al.</i> , 1995

Fermentação no estado semissólido (FESS)

A fermentação no estado semissólido (FESS) é a FES em um meio contendo líquido livre, o que permite uma melhor e mais fácil recuperação dos produtos solubilizados (Rodriguez Couto, Dominguez e Sanroman, 2001). Alguns exemplos de trabalhos que vêm sendo desenvolvidos utilizando esta técnica de fermentação são: produção de bioetanol (Economou *et al.*; 2010) e produção de enzimas (Majeau; Brar e Tyagi, 2010). Não há estudos relatados de produção de GA₃ por FESS.

4.5.4. Biorreatores para produção de GA₃

Biorreatores (reatores bioquímicos ou reatores biológicos) são reatores químicos onde ocorre uma série de reações químicas catalisadas por

biocatalisadores. Estes biocatalisadores podem ser enzimas ou células vivas (microbianas, animais e vegetais). Os biorreatores podem ser classificados em dois grandes grupos: biorreatores enzimáticos, nos quais as reações ocorrem na ausência de células vivas e, biorreatores em que as reações ocorrem na presença de células vivas (Schmidell *et al.*, 2001).

O tanque cilíndrico é o reator mais utilizado em bioprocessos. Existe uma grande quantidade de tipos (configurações) de biorreatores e, dentre os tipos de biorreatores existentes, há os biorreatores do tipo tanque agitado e os biorreatores do tipo coluna de bolhas (Doran, 1995), os quais operam em sistemas submersos, ou seja, o substrato está na fase líquida.

Tanque agitado (Stirred Tank Reactor – STR)

Biorreatores do tipo tanque agitado (STR) são reatores agitados mecanicamente através de pás internas (impelidores). O sistema de aeração é feito através de um compressor de ar e a sua entrada no biorreator é feita pela parte inferior sendo que a distribuição ocorre através de difusores. A troca de calor é feita através de serpentina interna ou de camisa externa (Doran, 1995).

Coluna de bolhas

Os biorreatores do tipo coluna de bolhas são reatores agitados pneumaticamente, ou seja, o sistema não possui impelidores e a agitação é realizada através da injeção de ar. São utilizados industrialmente para produção de leveduras de panificação, cerveja e vinagre, para tratamento de águas residuais, entre outros (Doran, 1995; Kantarcia, Borak, e Ulgen, 2005).

O biorreator de coluna de bolhas apresenta algumas vantagens sobre o STR, tais como: excelente transferência de calor e de massa. Baixo custo de operação e de conservação devido à ausência de partes móveis internas e ser compacto. A durabilidade do material do biorreator é maior (Kantarcia, Borak, e Ulgen, 2005).

O biorreator de coluna de bolhas é de uma estrutura muito simples. Consiste em um recipiente cilíndrico com altura de tamanho superior ao dobro do tamanho do diâmetro. A única estrutura interna presente é o difusor para injeção de ar. Neste tipo de biorreator, a hidrodinâmica depende do comportamento das bolhas formadas no difusor. Ao utilizar baixas taxas de aeração, produzem-se bolhas com fluxo homogêneo, ou seja, as bolhas tem fluxo ascendente, na mesma velocidade e não

mistura de bolhas. Ao utilizar altas taxas de aeração, o fluxo de ar é denominado heterogêneo, em que as bolhas têm um fluxo caótico de circulação e há mistura entre bolhas (Kawagoe *et al.*, 1976; Doran, 1995).

4.5.5. Microrganismos produtores de GA_3

Um grande número de microrganismos é conhecido como produtor de giberelinas, incluindo fungos filamentosos, leveduras e bactérias (MacMillan, 2002).

Industrialmente, os microrganismos utilizados para produção de GA_3 são *Gibberella fujikuroi* (estágio sexuado) e *Fusarium moniliforme* (estágio assexuado), os quais recentemente foram reclassificados como *Fusarium verticillioides* (Leslie e Summerell, 2006).

Após o descobrimento e isolamento do fungo causador da “bakanae”, sua posição taxonômica foi fracamente definida. A falta de nomenclatura sistemática para o gênero levou a uma confusão considerável na definição do fungo produtor das giberelinas (Machado, 2002). Atualmente a classificação esta bem estabelecida (The NCBI Taxonomy, 2012):

Superreino: *Eukaryota*

Reino: *Fungi*

Filo: Ascomycota

Subfilo: *Pezizomycotina*

Classe: *Sordariomycetes*

Ordem: *Hypocreales*

Família: *Nectriceae*

Gênero: *Gibberella*

Espécie: *Gibberella fujikuroi*

Morfologicamente, não há diferenças visíveis entre as características de *G. fujikuroi* ou *F. moniliforme*. A cor e forma de crescimento destes fungos podem variar de acordo com o meio de crescimento utilizado, temperatura e a rotina de manutenção das cepas. Em meio BDA (Batata Dextrose Agar), inicialmente as culturas tem micélio branco, mas podem desenvolver pigmentos violeta ao longo do tempo (Leslie e Summerell, 2006).

Em microscopia óptica, se observa uma diferença entre o estágio sexuado e assexuado deste fungo. A principal característica do *F. moniliforme* é a produção de

conídios em forma de foice com extremidades afiladas constituindo fusos hialinos chamados macro ou microconídios (levemente curvos ou inclinados). Enquanto que *G. fujikuroi* (sexuado) não apresenta este tipo de formação (Leslie e Summerell, 2006). Os conídios de *F. moniliforme* podem ser visualizados na Figura 6, na qual os macroconídios estão apresentados nas regiões A e B e os microconídios estão apresentados nas regiões C e D.

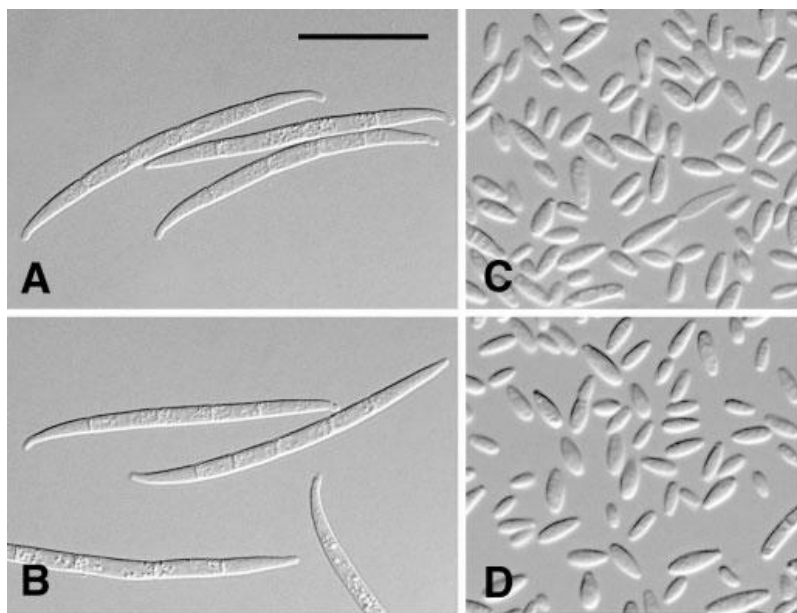


Figura 6. Conídios de *F. moniliforme*. A-B: macroconídios, C-D: microconídios

FONTE: Leslie e Summerell (2006).

4.5.6. Substratos

O Brasil possui uma das mais importantes economias baseadas na agricultura no mundo, por sua produção de café, cana-de-açúcar, soja, frutas, entre outros (Soccol e Vandenberghe, 2003).

Os resíduos de processos agrícolas, gerados em abundância no Brasil, causam graves problemas ambientais quando dispostos na natureza. A aplicação destes resíduos, além de ser uma alternativa em termos de substrato em processos fermentativos, auxilia na redução dos problemas de poluição ambiental (Soccol e Vandenberghe, 2003).

Polpa Cítrica

O Brasil é o maior produtor de laranjas no mundo, com aproximadamente 25% da produção mundial. Em 2011, a produção de laranja no Brasil foi de 19.831.787 toneladas (IBGE, 2012). Os subprodutos provenientes da laranja são:

suco, células congeladas, óleos essenciais, limoneno, líquidos aromáticos e farelo de polpa cítrica.

A polpa cítrica (Figura 7) é um subproduto da agroindústria de suco de laranja composta basicamente por cascas, sementes e bagaço de laranja. A polpa cítrica representa em torno de 50 % do fruto e é comercializada na forma de *pellets* (Crutale, 2012). A exportação anual da polpa cítrica gira em torno de um milhão de toneladas por ano e o preço é em torno de R\$ 295,00 por tonelada. É usada como complemento para a ração animal, principalmente na pecuária (Alcance Pecuária, 2012). A composição da polpa cítrica é apresentada na Tabela 4.



Figura 7. Polpa cítrica peletizada.

FONTE: Safra corretora de cereais (2012).

Tabela 4. Composição da polpa cítrica

Composição	Quantidade
Umidade (%)	11,42
Cinzas (%)	7,89
Proteínas (%)	6,30
Açúcares Totais (%)	20,22
pH	5,76
Aw	0,660
Fe (mg/kg)	174,5
Cu (mg/kg)	8,4
Zn (mg/kg)	8,2
Na (mg/kg)	180,0
K (mg/kg)	6880,0
Mg (mg/kg)	868,0
Fluoreto (mg/kg)	100,11
Nitrato (mg/kg)	375,76
Fosfato (mg/kg)	149,16
Sulfato (mg/kg)	201,74

FONTE: Rodrigues, 2010.

Manipueira

O Brasil é o segundo maior produtor de mandioca, com 26,43 milhões de toneladas anuais na safra 2010-2011 (MAPA, 2012). O processo de industrialização da mandioca causa sérios problemas ambientais em função de sua disposição na natureza. Fábricas de pequeno porte produzem quantidades significativas de resíduos (ABAM, 2012).

A manipueira é um resíduo líquido resultante do processamento da mandioca, na fabricação de farinha e fécula. Para o processo de lavagem de uma tonelada de raiz, as empresas utilizam em média seis mil litros de água. Essa água de lavagem contém elementos como o nitrogênio, o fósforo, o potássio e o cálcio, que a torna viável para a fertirrigação de pastagens (ABAM, 2012).

Quanto à composição química da MAN, dependendo do tipo de prensa utilizada, pode conter fécula, proteínas, glicose, restos de células, ácido cianídrico, substâncias orgânicas e nutrientes minerais essenciais (Borghetti, 2009). A composição da MAN é apresentada na Tabela 5.

Tabela 5. Composição da manipueira

Composição	Quantidade
N (%)	0,15
P (ppm)	255,80
K (meq/l)	51,22
Ca (meq/l)	12,62
Mg (meq/l)	35,38
S (ppm)	137,00
Fe (ppm)	16,60
Zn (ppm)	3,70
Mn (ppm)	5,65
Cu (ppm)	0,90
Na (ppm)	14,00
pH	4,03

FONTE: Borghetti (2009).

Melaço de cana-de-açúcar

A lavoura de cana-de-açúcar continua em expansão no Brasil. A previsão de produção para 2012 é de 571,471 milhões de toneladas (Conab, 2012).

O melaço é um subproduto do processamento da cana de açúcar. É resultante da cristalização final do açúcar. Em torno de 60 % dos sólidos são compostos por sacarose, glicose e frutose (ICIDCA, 1999). Além dos açúcares, há também compostos tais como: aminoácidos, ácidos carboxílicos alifáticos e olefínicos, vitaminas, proteínas, fenóis e outros. Entre os cátions encontrados, o

potássio, o cálcio e o magnésio. Do nitrogênio presente no melaço somente 35% são assimilados, na forma de proteína pura, contando com um adicional de 7% de componentes nitrogenados na forma de ácidos nucleicos, aminoácidos livres e outros compostos. A composição de aminoácidos no melaço é de 1%, entre os quais se destacam os ácidos aspárticos e glutâmicos, que constituem mais de 70% do total (Arakaki, 2010). A composição do melaço de cana-de-açúcar é apresentada na Tabela 6.

Tabela 6. Composição do melaço de cana-de-açúcar

Componente	Valor
Açúcares Totais (g/L)	540,98
Açúcares Redutores (g/L)	54,99
Sólidos solúveis (°Brix)	59,5
Proteína (g/L)	45,5

FONTE: Roepcke, 2007

Melaço de soja

A produção de soja é uma das mais importantes do Brasil. Cerca de 75% da soja produzida no país é exportada. A produção de soja no país é de 71,75 milhões de toneladas (Conab, 2012).

A soja é uma das principais fontes vegetais de óleo comestível, além de ser fonte de proteína para a alimentação. O grão da soja contém cerca de 40% de proteína, 20% de gordura, 5% de cinzas e 35% de carboidratos, em base seca. A soja é um dos componentes na fabricação de rações animais e seu consumo vem aumentando na alimentação humana (Roepcke, 2007).

O melaço de soja é um subproduto da indústria de processamento da soja o qual contém uma grande quantidade de açúcares tais como: sacarose, frutose, rafinose, estaquiase, entre outros. Além de açúcares, contém lipídios, flavonóides, proteínas e minerais. Por causa da grande quantidade de açúcares, o melaço de soja tem sido empregado em processos fermentativos (Qureshi, Lolas e Blashek, 2001). A composição do MS é apresentada na Tabela 7.

Tabela 7. Composição do melaço de soja

Componente	Quantidade (%) (b.m.u.)
Estaquiase	18.6
Rafinose	9.68
Sacarose	28.4
Glicose	0.243
Frutose	0.127

Galactose	0.254
Açúcares totais	57.3
Proteínas	9.44
Lipídios	21.2
Fibras	5.7
Cinzas	6.36

FONTE: Karp, 2007; (b.m.u.) – base de massa úmida

Vinhaça de cana de açúcar

Para cada 1 litro de etanol produzido, é gerado em torno de 10 a 18 litros de vinhaça (Oliveira, 2010). A vinhaça é o produto de calda na destilação do licor de fermentação do álcool de cana-de-açúcar. É um líquido residual, também conhecido, regionalmente, por restilo e vinhoto. O constituinte principal da vinhaça é a matéria orgânica, basicamente sob a forma de ácidos orgânicos e, em menor quantidade, por cátions como o K, Ca e Mg (Silva, Griebeler e Borges, 2007).

A vinhaça é muito utilizada na fertirrigação, que é a aplicação do produto *in natura* em áreas de plantio de cana de açúcar. A fertirrigação nos canaviais foi intensificada a partir das proibições de despejo da VIN nos cursos d'água. Esta aplicação requer pouco investimento, baixo custo de manutenção, não envolve uso de tecnologia complexa e possibilita rápida eliminação de grandes quantidades de material (Oliveira, 2010).

A composição química da vinhaça proveniente do melaço de cana-de-açúcar é apresentada na

Tabela 8.

Tabela 8. Composição química da vinhaça de cana-de-açúcar proveniente do melaço

Componente	Quantidade
pH	4,2-5,0
Temperatura	80-100
DBO (mg/l)	25.000
DQO (mg/l)	65.000
Sólidos totais (mg/l)	81.500
Sólidos voláteis (mg/l)	60.000
Sólidos (fixos (mg/l)	21.500
Nitrogênio (mg/l N)	450-1.610
Fósforo (mg/l P)	100-290
Potássio (mg/l K)	3.740-7.830
Cálcio (mg/l MgO)	450-5.180
Magnésio (mg/l MgO)	420-1.520
Sulfato (mg/l SO ₄)	6.400
Carbono (mg/l C)	11.200-22.900
Relação C/N	16-16,27
Matéria orgânica (mg/l)	63.000
Subst. Redutoras (mg/l)	9.500

FONTE: Marques (2006)

4.6. Fatores que influenciam a produção de GA₃

A cinética de produção de GA₃ e crescimento de biomassa foi estudada primeiramente por Borrow *et al.* (1964). Durante a fase exponencial de crescimento da biomassa, glicose, nitrogênio e fosfato são consumidos. A produção de GA₃ inicia após a exaustão do nitrogênio (Rodrigues *et al.*, 2011).

4.6.1. Fontes de Carbono

As fontes de carbono que são muito utilizadas na produção de GA₃ são a glicose e a sacarose. Porém, concentrações acima de 20% de glicose podem causar repressão catabólica (Tudzynski, 1999). Fontes alternativas tais como maltose, manitol, amido e farinha de origem vegetal ou misturas com diferentes fontes de carbono como, glicerol, glicose e galactose também tem sido utilizadas (Darken, Jensen e Shu, 1959; Fuska *et al.*, 1961; Candau, Avalos e Cerdá–Olmedo, 1991; Pastrana *et al.*, 1995; Tomasini, Fajardo e Barrios González, 1997; Gelmi *et al.*, 2000; Machado *et al.*, 2001; Shukla, Chand e Srivastava, 2005). Gancheva *et al.* (1984) utilizaram óleo vegetal de girassol para produção de GA₃.

A influência da relação C:N está diretamente relacionada com o metabolismo de produção GA₃. Sendo assim, seus valores devem apresentar uma quantidade de nitrogênio mínima e suficiente para proporcionar um bom crescimento do micélio bem como quantidade de carbono disponível suficiente para a produção do metabólito secundário. A relação normalmente utilizada é alta, entre 6:1 e 45:1 (Machado, 2002).

4.6.2. Nitrogênio

A qualidade e a quantidade de nitrogênio no meio são muito importantes na fermentação para produção de giberelinas. Altas produções de GA₃ foram alcançadas em baixas concentrações de nitrogênio no meio (Borrow *et al.*, 1964; Tudzynski, 1999).

Diferentes fontes de nitrogênio foram avaliadas em relação ao seu efeito sobre a produção de GA₃. São consideradas fontes de nitrogênio favoráveis o sulfato de amônio, o cloreto de amônio, a glicina, o tartarato de amônio e a água de maceração de milho (Darken, Jensen e Shu, 1959; Fuska *et al.*, 1961; Kumar e Lonsane, 1989; Berrios, Pyle e Aroca, 2010).

4.6.3. Sais minerais e elementos-traço

Quanto à utilização de sais minerais e elementos-traço na biossíntese de GA₃, poucas informações são disponíveis a respeito de seus efeitos. Os sais considerados importantes para produção contêm magnésio, fosfato, potássio e sulfato. Elementos-traço como Fe, Cu, Mn, Mo, Zn, B, Al e Ca também são necessários para produção de GA₃, mas normalmente não são adicionados, sendo suficientes aqueles existentes como impurezas nos meios comerciais (Rodrigues *et al.*, 2011). Alguns minerais e elementos traço utilizados na produção de GA₃ estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Sais mineirais utilizados em fermentação para produção de GA₃.

Sais mineirais	Concentração	Referência
KH ₂ PO ₄	3-7 g/L	Shukla, Chand and Srivastava, 2005, Gelmi, Perez-Correa e Agostin, 2002, Escamilla <i>et al.</i> , 2000
	0,5 g/L	Berrios, Illanes e Aroca, 2004, Berrios, Pyle e Aroca, 2010
	0,5%	Lu, Xie e Kumakura, 1995
K ₂ HPO ₄	5 g/L	Pastrana <i>et al.</i> , 1995
	0,0095 g/5,9 mL	Gelmi <i>et al.</i> , 2000
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,5 - 2 g/L	Shukla, Chand e Srivastava, 2005, Escamilla <i>et al.</i> , 2000, Corona, Sanchez e Agostin, 2005
	0,0053 g/5,9 mL	Gelmi <i>et al.</i> , 2000
	0,45 g/L	Gelmi, Perez-Correa e Agostin, 2002
	0,07 g/L	Bandelier, Renaud e Durand, 1997
	0,1%	Lu, Xie e Kumakura, 1995
KCl	0,0048 g/5,9 mL	Gelmi <i>et al.</i> , 2000
FeSO ₄	mg/5,9 mL	Gelmi <i>et al.</i> , 2000
	0,07 g/L	Bandelier, Renaud e Durand, 1997
	10 mg/L	Lu, Xie e Kumakura, 1995
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	1,49 g/L	Corona, Sanchez e Agostin, 2005
	0,86 mg/5,9 mL	Gelmi <i>et al.</i> , 2000
	0,07 g/L	Bandelier, Renaud e Durand, 1997
	10 mg/L	Lu, Xie e Kumakura, 1995
CuSO ₄ . 5H ₂ O	1,07 mg/5,9 mL	Gelmi <i>et al.</i> , 2000
	0,07 g/L	Bandelier, Renaud e Durand, 1997
	10 mg/L	Lu, Xie e Kumakura, 1995

4.6.4. pH

O pH é um fator muito influente na seleção da giberelina a ser produzida. Para produção de GA₃, o valor inicial de pH geralmente está na faixa de 3,5 – 5,8. O aumento do pH levará a uma maior produção de GA_{4,7} e a diminuição do pH (abaixo de 3,5) leva a um aumento na produção de GA₁ (Kumar & Lonsane, 1989).

Alguns estudos descrevem os valores de pH utilizados para a produção de GA₃. Tomasini, Fajardo e Barrios-Gonzalez (1997) utilizaram farinha de mandioca

com um pH inicial de 6,0. Gelmi *et al.* (2000) empregaram Amberlite como suporte inerte com um pH inicial de 4,5. Machado *et al.* (2001) utilizaram bagaço de café e mandioca em pH 5,0-5,4. Shukla, Chand e Srivastava (2005) utilizaram farinha de arroz com um pH de 5,0. Meleigy e Khalaf (2009) usaram permeado de leite em pH 6,0. Berrios, Pyle e Aroca, (2010) utilizaram glicose e água de maceração de milho com um pH de 5,0.

4.6.5. Temperatura

O efeito da temperatura sobre a produção de GA₃ varia conforme o microrganismo utilizado (Rodrigues *et al.*, 2011). Diferentes condições de temperatura já foram estudadas: 25°C (Stodola *et al.*, 1955; Gelmi *et al.*, 2002), 27°C (Gohlwar, Sethi e Marwaha, 1984), 28,5 a 29,5°C (Borrow *et al.*, 1964), 28°C (Bandelier, Renaud e Durand, 1997), 29°C (Holme e Zacharia, 1965; Jefferys, 1970; Machado, Soccol e Pandey, 2002, Rodrigues *et al.*, 2009; Uthandi, Karthikeyan e Sabarinathan, 2010) e 30°C (Maddox e Richert, 1977; Escamilla *et al.*, 2000; Shukla, Chand e Srivastava, 2005; Meleigy e Khalaf, 2009; Berrios, Pyle e Aroca, 2010; Bilkay, Karakoç e Aksöz, 2010).

4.6.6. Aeração

A biossíntese de giberelinas compreende vários passos oxidativos, catalisados pelas citocromo P450 monooxigenases, dioxigenases e desidrogenases. Sendo assim, a aeração é um fator crítico na produção de GAs (Rodrigues, 2010). A taxa de consumo de oxigênio para a produção de micélio na fase logarítmica deve permanecer constante, enquanto a demanda por oxigênio aumenta aproximadamente de forma exponencial (Tudzynski, 1999).

Stodola *et al.* (1955) propuseram uma taxa de aeração de 0,25 vvm (volume de ar por volume de meio por minute). Holme e Zacharias (1965) utilizaram 0,6 vvm para reatores de 5 L e 0,25 vvm para reatores de 20 L. Bandelier, Renaud e Durand (1997) em FES utilizaram uma taxa de ar de 0,9 L de ar/(h.kg de material seco). Gelmi *et al.* (2000), utilizaram 0,46 L de ar/(h.kg de material seco). Berrios, Pyle e Aroca (2010) em FSm utilizaram taxa de aeração de 1 vvm.

4.7. Purificação

Do caldo fermentado, o GA₃ pode ser recuperado por adsorção ou por extração com solventes, purificado através de repetidas extrações líquido-líquido e concentrado em condições de vácuo (Shukla, Srivistava e Subhash, 2003).

Dentre os solventes orgânicos que solubilizam o GA₃, o acetato de etila é utilizado neste tipo de extração por ser imiscível em água. Rangaswamy, Mumbai e Balu (2008) purificaram o GA₃ produzido por fermentação (FSm e FES) utilizando o processo de extração com acetato de etila e, com sucessivas concentrações por evaporação e posterior cristalização. Rachev *et al.* (1993) utilizaram o processo de extração líquido-líquido com acetato de etila, para obtenção do cristal de GA₃ do caldo fermentado.

A extração em fase sólida pode ser empregada na limpeza e concentração de diferentes metabolitos, incluindo o GA₃. A extração consiste na retenção de compostos da amostra por um agente de sorção sólido e posterior eluição por solvente adequado, no qual o analito (composto retido) é eluído. Eluentes adequados, dependendo da natureza da amostra, são capazes de eluir seletivamente o analito (Rodrigues, 2010).

Dentre os agentes de sorção existentes, os mais utilizados são as alquil-sílicas, particularmente as C₈ e as C₁₈ (cadeias de 8 ou 18 átomos de carbono ligados covalentemente aos grupamentos silanol da sílica), ideais para sorção de compostos de média ou pouca polaridade (Chimelli, 2003). Sílicas de cadeias alquílicas longas e finamente divididas - possuem grande superfície de adsorção - são usadas para a retenção de moléculas de baixo peso molecular. Sílicas de cadeias alquílicas curtas e poros grandes são utilizadas para sorção de macromoléculas (Rodrigues, 2010). Esta técnica é empregada na preparação de amostras contendo GA₃ a serem analisadas por CLAE (Machado, 2000; Escamilla *et al.*, 2000; Chimelli, 2003). Outras resinas macroporosas comerciais também têm a capacidade de sorção e dessorção de moléculas como GA₃. Heropolitanski, Kominiaki e Machalowska (1994) estudaram sorção e dessorção de GA₃ por resinas do tipo Amberlite XAD-16.

A utilização de carvão ativado para purificação de metabólitos produzidos por fermentação tem mostrado grande potencial (Rodrigues, 2010). O carvão ativado é um material carbonoso poroso. Apresenta uma forma microcristalina, não grafítica, que sofre um processamento para aumentar a porosidade interna (Rodriguez Reinoso e Sabio-Molina, 1998).

A aplicação dos materiais carbonosos porosos como adsorventes se baseia principalmente em suas propriedades texturais e em sua natureza química. As propriedades texturais dos carvões ativados se fundamentam em duas características importantes: tamanho de poro e a área superficial, que definem a utilização dos carvões ativados e sua capacidade de adsorver e dessorver moléculas. As propriedades físicas da superfície são descritas pela área superficial específica e porosidade, enquanto que as propriedades químicas dependem da presença ou ausência de grupos ácidos ou básicos sobre sua superfície (Moreno-Castilla, 2004; Rodrigues, 2010).

4.8. Análise do GA₃

Inicialmente, os métodos de quantificação de GA₃ eram baseados em bioensaios realizados em plantas (Rodrigues *et al.*, 2011). Os bioensaios tiveram uma grande importância na identificação das giberelinas, existindo um total de 33 sistemas teste incluindo diferentes partes, órgãos ou funções de plantas (Machado, 2002). Bioensaios são utilizados quando são requeridos altos níveis de especificidade e sensibilidade, mas não são adequados para monitoramento de GA₃ durante uma fermentação, em que são requeridos resultados rápidos (Rodrigues *et al.*, 2011).

Durante o processo fermentativo, diferentes GA_s são sintetizadas. Métodos rápidos e simples foram desenvolvidos para analisar o GA₃. Estes métodos são análises espectrofotométricas, colorimétricas e fluorométricas (Berríos, Illanes e Aroca, 2004).

4.8.1. Método espectrofotométrico

O método espectrofotométrico baseia-se na conversão do GA₃ em ácido giberelênico, pela ação de ácidos fortes. A absorbância do ácido giberelênico é medida em 254 nm. A calibração é feita com GA₃ na concentração de 1 a 4 mg/L, pois nessa faixa de concentração a curva de calibração é reprodutível e linear (Holbrook, Edge e Baily, 1961). É um método rápido e específico para o GA₃, rotineiramente utilizado para a análise de caldos fermentados.

A

Tabela 10 apresenta estudos que utilizaram o método espectrofotométrico para análise de GA₃.

Tabela 10. Extração e análise espectrofotométrica de GA₃

Extração de GA₃	Análise	Referência
10 mL extrato, 0,5 mL solução de acetato de zinco, 0,5 mL solução de ferrocianeto de potássio, centrifugado por 15 min. 2,5 mL do sobrenadante com 7,5 mL etanol e 90 mL HCl (30%). Incubado a 20°C por 75 min	Leitura 254 nm em espectrofotômetro - UV	Lu, Xie e Kumakura, 1995
Extração com tampão fosfato pH 7,4 (proporção 2/1 v/m), durante 20 min a 200 rpm, filtrado e novamente extraído. 30 mL do extrato, 10 mL de etanol, 2 mL de acetato de Zn (repouso 2 min), 2 mL de ferrocianeto de potássio e água (q.s.p. 50 mL). Filtrado e analisado	Leitura 254 nm em espectrofotômetro – UV	Machado, 2002.
1 mL da amostra e 1 mL de etanol, adiciona HCl 3,75 M (q.s.p. 10 mL). Agitado vigorosamente por 10 s. A temperatura do processo é mantida a 20 ± 0,5 °C	Leitura 254 nm em espectrofotômetro – UV	Berríos, Illanes e Aroca, 2004.

FONTE: Rodrigues, 2010

4.8.2. Análise fluorométrica

Utilizada para identificar o GA₃ e o ácido giberelênico nos meios fermentativos. Baseia-se na fluorescência destes compostos pela ação de ácido sulfúrico 85%. Porém, não há separação entre os dois compostos. Uma vez que a ação biológica do ácido giberelênico é muito baixa se comparada à do GA₃ este método conduz a resultados falsos (Kumar e Lonsane, 1989; Machado, 2002).

4.8.3. Análise espectrofluorodensitométrica

Envolve a separação do GA₃ por cromatografia de camada delgada utilizando sistema de solventes constituído de clorofórmio, acetato de etila, ácido acético glacial na razão 5:4:1, aquecimento em forno a 100 °C por 30 minutos e análise da fluorescência produzida em espectrofluorodensitômetro a 254 nm sob luz ultravioleta (Kumar e Lonsane, 1989; Machado, 2002).

4.8.4. Cromatografia de camada delgada

É um método simples e eficiente de identificação de giberelinas, existindo diversos trabalhos relatando os valores de R_f para diferentes sistemas. Normalmente utiliza-se como fase móvel uma mistura de acetato de etila, ácido acético e clorofórmio e como revelador ácido sulfúrico concentrado. A maior desvantagem é ser qualitativo, não podendo ser utilizado se for necessária uma quantificação acurada do metabólito (Russell, 1976, citado por Machado, 2002).

4.8.5. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A CLAE promove separação de diferentes tipos de giberelinas com boa resolução, incluindo isômeros, além de uma quantificação precisa, sendo potencialmente atrativo para esses fitohormônios polares e termicamente lábeis. Os detectores de UV têm sido utilizados em CLAE para a separação de fitohormônios em amostras de plantas (Barendse e Van de Werken, 1980; Sandberg *et al.*, 1987; Lin *et al.*, 1991; Dobrev *et al.*, 2005).

Dois tipos de colunas podem ser utilizadas, a μ Bondapak C18 e Radial-Pak-A. A fase móvel consiste de na maioria das vezes, metanol-água destilada acidificada com ácido fosfórico em pH3, com detecção a 203 ou 206 nm (Machado, 2002). Na

Tabela 11 são mostradas algumas metodologias que utilizam a CLAE para quantificar GA₃.

Tabela 11. Metodologias de extração e análise de GA₃ por CLAE

Condições de extração	Condições de análise	Referência
Padrão de ácido giberélico Sigma dissolvido em metanol	Coluna: fase reversa μ Bondapak C ₁₈ Detector: UV a 203 nm Fase móvel: água bidestilada - 20% metanol e 0,01 M H ₃ PO ₄ , pH 2,3 ajustado com KOH, 2 mL/min.	Barendse <i>et al.</i> , 1980.
Extração a pH 2,5 1:3 (fermentado: solução de etanol a 10% (v/v)), agitado a 100 rpm por 1h a 25°C, clarificado, centrifugado, filtrado. O filtrado é diluído 1:1 em solução aquosa de metanol 40% (v/v).	Coluna: fase reversa μ Bondapak C ₁₈ Detector: UV a 206 nm	Bandelier <i>et al.</i> , 1997.
Filtrado ajustado pH 2,5 e extraído por acetato de etila, evaporado a vácuo e o resíduo dissolvido em 1 mL de metanol.	Coluna: fase reversa C ₁₈ Detector: UV a 255nm Fase móvel: metanol e ácido acético 0,05% (20/80, v/v); gradiente linear por 20 min até 60/40 (v/v) – 1 mL.min ⁻¹ – tempo de retenção de 17 min.	Nemat Alla e Hassan, 1998.
10 mL amostra extraída em tampão fosfato pH 2,5 com HCl 5%; passado em coluna com 250-300 mg de sílica C-18 (55-105 μ m).	Coluna: C-18 temperatura ambiente Detector: UV a 205nm Fase móvel: solvente A (metanol) e solvente B (água com pH 3,0 com ácido fosfórico), proporção 70:30 – fluxo de 1,00 mL.min ⁻¹	Machado, 2000.
10 mL do extrato acidificado pH 2,5 com HCl 10% e extraído 3 vezes com acetato de etila; a fase orgânica seca a vácuo e re-dissolvida em metanol.	Coluna: fase reversa Bondapak C-18 a 25°C Detector: UV a 204nm Fase móvel: metanol e tampão KH ₂ PO ₄ (75:25) - 1,8 mL.min ⁻¹	Escamilla <i>et al.</i> , 2000.
5 mL de amostra passada pela coluna sílica C18 (gravidade) seguido de 10 mL de mili-Q a vácuo. Eluição com acetonitrila-água 80/20 e volume completado para 5 mL.	Coluna: C-18 marca Rainin Detector: UV a 205nm Fase móvel: acetonitrila-água (30:70) por 6min e acetonitrila água (90:10) nos últimos 13 min	Chimelli, 2003.
Extrato filtrado em Millipore 0,45 μ m	Coluna: C-18 a 45°C	Shukla <i>et al.</i> ,

Condições de extração	Condições de análise	Referência
com pH ajustado 2,5 com HCl 10%.	Detector: UV a 254nm Fase móvel: 30% de metanol contendo ácido fosfórico a 0,01 M	2005.

FONTE: Rodrigues, 2010

4.8.6. Espectrometria de massa (EM)

A espectrometria de massa (EM) apresenta maior sensibilidade e especificidade em comparação a outros métodos de análise e tem a vantagem de identificar o analito (Rodrigues *et al.*, 2011). A combinação entre a cromatografia gasosa e a espectrometria de massa (CG-EM) é altamente sensível e seletivo de análise pode ser utilizado para análise quantitativa das GAs endógenas. Embora a CG-EM mostre ótimo desempenho, há o inconveniente da realização dos procedimentos de derivação de giberelinas, os quais são sempre indispensáveis para a separação por CG (Pearce, Koshioka e Pharis, 1994, Taylor, Blake, e Crisp, 2000; Birkemeyer, Kolasa e kopka, 2003).

O desenvolvimento da cromatografia líquida (CL) combinada com a EM (CL-EM) permite a análise direta de compostos GAs no eluente da CL, sem as modificações químicas necessárias para a análise por CG (Pearce *et al.*, 1994; Stephan, Bangerth e Schneider, 1999; Ma *et al.*, 2008, Rodrigues *et al.*, 2011).

CAPÍTULO 1

SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS E SUBSTRATOS PARA A PRODUÇÃO DE GA₃ E ESTUDO DA PREPARAÇÃO DE INÓCULO DA LINHAGEM SELECIONADA

RESUMO

O ácido giberélico (GA₃) é um importante hormônio vegetal, pertencente à família das giberelinas, o qual pode ser encontrado em plantas, fungos e bactérias. O GA₃ regula a taxa de crescimento das plantas sendo extensivamente utilizado para produzir uma série de efeitos benéficos. Neste capítulo será apresentado o estudo de seleção de cepas e substrato com maior capacidade de produzir GA₃. Quatro linhagens de *Gibberella fujikuroi* e uma de *Fusarium moniliforme* foram testadas quanto à sua capacidade de acumular GA₃. Os ensaios foram conduzidos em meio sintético ICI por fermentação submersa. A cepa *Gibberella fujikuroi* LPB-06 produziu uma maior concentração de GA₃, 248,3 mg/L. A cepa selecionada foi então utilizada no estudo da seleção de substratos alternativos incluindo importantes subprodutos da agroindústria tais como: extrato aquoso de polpa cítrica (EAPC), manipueira (MAN), melaço de cana-de-açúcar (MC), melaço de soja (MS) e vinhaça (VIN). O EAPC e o MS foram selecionados para a produção de GA₃. A produção de GA₃ em EAPC foi de 130 mg/L (produtividade de 0,9 mg/L.h) em 144 horas de cultivo e, em MS a produção foi de 120 mg/L (produtividade de 0,6 mg/L.h) em 192 horas. Em seguida, foi realizado o estudo da preparação do inóculo com a linhagem selecionada nos substratos selecionados, MS e EAPC. Em MS, houve um ganho de produtividade de 72 horas na produção de GA₃, a produção máxima foi de 130,8 mg/L (produtividade de 0,9 mg/L.h) obtida em 144 horas de fermentação. Em EAPC, a máxima concentração de GA₃ (149,4 mg/L e produtividade de 1,2 mg/L.h) foi obtida em 120 horas de fermentação. Houve aumento da produção de GA₃ de 121,8 mg/L para 149,4 mg/L e houve um ganho de produtividade de GA₃ de 0,3 mg/L.h (ganho no tempo de fermentação de 48 horas).

Palavras-chave: Ácido Giberélico, *Gibberella fujikuroi*, *Fusarium moniliforme*, polpa cítrica, inóculo

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, 136 giberelinas são conhecidas, as quais foram identificadas de plantas, fungos e bactérias (McMillan, 2002; Bömke C., Tudzynski B.; 2009). Das

giberelinas isoladas, o ácido giberélico (GA_3) tem recebido a maior atenção, pois regula a taxa de crescimento das plantas sendo extensivamente utilizado para produzir uma série de efeitos benéficos tais como: controle da germinação de sementes, alongamento da parte aérea, indução da florescência, melhora do rendimento, entre outros (Tudzynski, 1999; Shukla, 2003).

O ácido giberélico (GA_3) pode ser encontrado em plantas e produzido por microrganismos como fungos e bactérias (McMillan, 2002). Os microrganismos, devido à sua facilidade de manipulação e capacidade de multiplicação e produção do ácido em ambientes controlados, são empregados industrialmente. Há a necessidade de se realizar uma seleção de microrganismos que produzam altas concentrações desta biomolécula. Linhagens de *Gibberella fujikuroi* e *Fusarium moniliforme* são conhecidas por sua capacidade de acumular GA_3 . Alguns pesquisadores empregaram estes microrganismos em diversos estudos, porém com o emprego de meios sintéticos e de alto custo.

No Brasil, em 2011 a agricultura representou 22,74% do Produto Interno Bruto (PIB) e 38 % das exportações totais (CEPEA-ESALQ/USP, 2012; Ministério da Agricultura - MAPA, 2012). Uma grande diversidade de resíduos e subprodutos da agroindústria é gerada anualmente no mundo e em especial no Brasil. A aplicação destes resíduos em diferentes processos fermentativos, além de estimular a utilização de diferentes substratos, auxilia na redução dos problemas de poluição ambiental. Para viabilizar qualquer processo produtivo industrial é necessário utilizar matérias primas baratas e baixar os custos da produção, sem prejuízo à qualidade do produto final (Soccol e Vandenberghe, 2003).

A polpa cítrica (PC) é um subproduto da agroindústria de suco de laranja composta basicamente por cascas, sementes e bagaço de laranja. A PC representa em torno de 50 % do fruto e é comercializada na forma de *pellets*. É usada como complemento para a ração animal, principalmente na pecuária (Cutrale, 2012).

A manipueira (MAN) é um resíduo líquido resultante do processamento da mandioca, na fabricação de farinha e fécula. Devido à presença de nitrogênio, fósforo, potássio e cálcio, a manipueira é utilizada para a fertirrigação de pastagens (ABAM, 2012).

O melaço da cana-de-açúcar (MC) é um subproduto do processamento da cana de açúcar. É resultante da cristalização final do açúcar. Em torno de 60 % dos sólidos são compostos por sacarose, glicose e frutose (ICIDCA, 1999).

A vinhaça (VIN) é o produto de calda na destilação do licor de fermentação do álcool de cana-de-açúcar. O constituinte principal da vinhaça é a matéria orgânica, basicamente sob a forma de ácidos orgânicos e, em menor quantidade, por cátions como o K, Ca e Mg (Silva *et al.*, 2007).

O melaço de soja (MS) é um subproduto da indústria de processamento da soja o qual contém uma grande quantidade de açúcares tais como: sacarose, frutose, rafinose, estaquiose, entre outros. Além de açúcares, contém lipídios, flavonóides, proteínas e minerais. Por causa da grande quantidade de açúcares, o MS tem sido empregado em processos fermentativos (Qureshi *et al.*, 2001).

O processo fermentativo envolve uma etapa de desenvolvimento de inóculo, o qual é o preparo de uma população de microrganismos de uma cultura estoque em estágio de latência para um estágio ativo para inocular um fermentador de produção final. Embora o desenvolvimento de inóculo tenha sido reconhecido como um fator importante no aumento da produtividade na fermentação industrial há poucos estudos sobre desenvolvimento de inóculo (Webb e Kamat, 1993; Pio, Fraga e Macedo, 2008).

Nesta parte do trabalho foi realizada a seleção de linhagem(ens) com capacidade de acumular o hormônio vegetal, GA₃. Em seguida, foi realizada a seleção de substrato alternativo de baixo custo para a produção de GA₃. Tendo selecionado a(s) linhagem(ens) e o substrato a serem empregados no processo, o estudo do preparo do inóculo foi conduzido.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismos

Os microrganismos utilizados no presente trabalho foram obtidos do banco de cepas do Laboratório de Processos Biotecnológicos I (LPB-I), da Divisão de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, da Universidade Federal do Paraná. As cepas são: *Gibberella fujikuroi* LPB-BCA, LPB-02, LPB-05, LPB-06 e *Fusarium moniliforme* LPB-03.

Foram utilizados também fungos com características morfológicas semelhantes às do gênero *Gibberella* e isolados de diferentes fontes, em trabalhos anteriores. As linhagens foram isoladas do solo (G42, H12, H21, H31), bambu (1B) e

cana de açúcar (3C1 e 3C2). Todas foram aplicadas em testes fermentativos quanto à produção de GA₃.

As cepas foram mantidas em meio PDA (*Potato Dextrose Agar*) a 4 °C e foram repicadas para um novo meio PDA de cultivo a cada 3 meses.

2.2. Substratos

Foram utilizados cinco subprodutos da agroindústria brasileira como substratos para produção de GA₃. Os substratos testados são: Extrato Aquoso de Polpa Cítrica (EAPC), Manipueira (MAN), Melaço de cana (MC), Melaço de Soja (MS) e Vinhaça (VIN).

A MAN foi fornecida pela empresa Podium Alimentos. O MS é proveniente da empresa IMCOPA. A VIN e o MC foram fornecidos pela empresa Ouro Fino Agronegócio. A PC foi fornecida pela empresa Coalma Comércio de Produtos para Alimentação Animal, na forma de *pellets*.

A MAN, o MC, o MS e a VIN foram mantidas a baixa temperatura (em torno de 4 °C) a fim de manter suas características e impedir contaminações. Os mesmos foram diluídos de forma a obter uma concentração equivalente de fonte de carbono a ser empregada no processo de fermentação.

A PC foi mantida na forma sólida a temperatura ambiente e o EAPC foi preparado no momento do uso. O EAPC é obtido utilizando 5 g de PC moída (granulometria menor que 5 mm) em 50 mL de água. Essa suspensão é levada a ebulição por 30 minutos em banho-maria e então filtrada para remoção dos sólidos suspensos (Rodrigues, 2010).

Foram realizadas as seguintes análises para caracterização química dos substratos: açúcares totais e açúcares redutores (Somogyi, 1937; Nelson, 1944), proteínas (método de Kjeldahl) e lipídios (método Bligh Dyer) e pH (potenciométrico). Os métodos de Kjeldahl e Bligh Dyer foram realizados conforme as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, 1985). Todas as análises foram desenvolvidas nos Laboratórios de Processos Biotecnológicos I e II (LPB I e II) da UFPR, a exceção das análises de proteínas que foram realizadas no Laboratório de Pesquisas Hidrogeológicas (LPH) da UFPR.

2.3. Seleção de cepas produtoras de GA₃ por fermentação submersa

Nesta etapa, as cepas de *Gibberella fujikuroi*, *Fusarium moniliforme* e os microrganismos isolados de diferentes fontes naturais foram testados quanto à capacidade de produzir GA₃ por fermentação submersa.

A seleção foi realizada em meio cultivo ICI, utilizado para produção de GA₃. O meio de cultivo é composto de 80 g/L de D-glicose, 1 g/L de NH₄NO₃, 5 g/L de KH₂PO₄, 1 g/L de MgSO₄.7H₂O, elementos traços e pH 5,0 (Candau; Avalos e Cerda-Olmedo, 1992). O meio foi acondicionado em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 ml de meio de cultivo e, foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

Os fungos foram cultivados em tubos de ensaio contendo meio PDA inclinado e incubados a 30 °C por 168 horas. O micélio foi raspado do meio de cultivo com auxílio de uma alça de níquel e então inoculado nos frascos de Erlenmeyer contendo meio ICI.

A fermentação foi conduzida a 29 °C sob agitação de 120 rpm. Amostras foram retiradas após 168, 216 e 264 horas de fermentação para análise de GA₃ e biomassa.

2.4. Cinética de produção de GA₃ em meio ICI utilizando *Gibberella fujikuroi* LPB-06

Com a cepa *Gibberella fujikuroi* LPB-06 selecionada, foi realizada uma cinética de produção de GA₃, crescimento de biomassa e consumo de açúcares em meio de cultivo ICI. O meio foi acondicionado em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 ml de meio de cultivo e, foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

A cepa *Gibberella fujikuroi* LPB-06 foi cultivada em tubos de ensaio contendo meio PDA inclinado e incubada a 30 °C por 168 horas. O micélio foi raspado do meio de cultivo com auxílio de uma alça de níquel e então inoculado nos frascos de Erlenmeyer contendo meio ICI.

A fermentação foi conduzida a 29 °C sob agitação de 120 rpm em incubadora tipo shaker. Amostras foram retiradas a cada 24 horas (tempo total de 264 horas) para análise da concentração de GA₃, concentração de biomassa, pH e concentração de açúcares redutores.

2.5. Seleção de subprodutos da agroindústria como substrato para produção de GA₃

Após a etapa de seleção de cepas, as cepas *Gibberella fujikuroi* LPB-02, *Fusarium moniliforme* LPB-03 e *Gibberella fujikuroi* LPB-06 foram testadas separadamente quanto à produção de GA₃ nos seguintes substratos: extrato aquoso de polpa cítrica (EAPC), manipueira (MAN), melaço de cana (MC), melaço de soja (MS) e vinhaça (VIN). Os substratos foram padronizados em relação à concentração de açúcares totais (8 g/L). Essa quantidade de açúcares corresponde a 30% (v/v) de MAN, 2% (m/v) de MS, 1% (v/v) de MC e 5% (m/v) de PC no extrato aquoso. No caso da VIN, a quantidade de açúcares é inferior a 8 g/L, por isso foi utilizado 50% (v/v) de VIN suplementada com adição de 8 g/L de sacarose.

Realizou-se um planejamento experimental para misturas do tipo Simplex Lattice, o qual está apresentado na Tabela 12. Neste tipo de planejamento, os substratos são testados separadamente e as misturas, 2 a 2, entre cada um deles. O pH dos meios foi ajustado para 5,0 e, 50 mL dos meios foram acondicionados em frascos Erlenmeyers de 250 mL.

As cepas *Gibberella fujikuroi* LPB-02 e LPB-06 e *Fusarium moniliforme* LPB-03 foram cultivadas em tubos de ensaio contendo meio PDA inclinado e incubadas a 30 °C por 7 dias. O micélio foi raspado do meio de cultivo com auxílio de uma alça de níquel e então inoculado nos frascos de Erlenmeyer.

A fermentação foi conduzida a 29 °C e 120 rpm. Os frascos foram incubados em shaker. A análise de GA₃ foi realizada com a retirada de amostras após 144 e 192 horas de fermentação, pois conforme testes preliminares, a maior produção ocorre neste período.

Tabela 12. Planejamento experimental para mistura de substratos

Ensaio	EAPC	MAN	MC	MS	VIN
1	1	0	0	0	0
2	0	1	0	0	0
3	0	0	1	0	0
4	0	0	0	1	0
5	0	0	0	0	1
6	0,5	0,5	0	0	0
7	0,5	0	0,5	0	0
8	0,5	0	0	0,5	0
9	0,5	0	0	0	0,5
10	0	0,5	0,5	0	0
11	0	0,5	0	0,5	0
12	0	0,5	0	0	0,5
13	0	0	0,5	0,5	0

<i>Ensaios</i>	<i>EAPC</i>	<i>MAN</i>	<i>MC</i>	<i>MS</i>	<i>VIN</i>
14	0	0	0,5	0	0,5
15	0	0	0	0,5	0,5

EAPC – Extrato aquoso de polpa cítrica; MAN – Manipueira, MC – Melaço de cana; MS – Melaço de soja, VIN – Vinhaça,

O número 1 corresponde a 100% da quantidade de cada substrato. O 0,5 corresponde a 50% da quantidade de cada substrato e o 0 corresponde à ausência do substrato.

2.6. Estudo do preparo de inóculo

Para esta etapa, foi selecionada previamente a cepa *Gibberella fujikuroi* LPB-06 e os substratos a base de MS a 2% e EAPC a 5%, melhores substratos para produção de GA₃ determinados em ensaios anteriores.

O meio líquido a base de MS a 2% foi preparado e 30 mL foram acondicionados em frascos de Erlenmeyer de 125 mL. O meio líquido a base de EAPC a 5% (5% de PC em extrato aquoso) foi preparado e 30 mL foram acondicionados em frascos Erlenmeyer de 125 mL. Os meios de cultivo foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

A cepa *Gibberella fujikuroi* LPB-06 foi cultivada em tubos de ensaio contendo meio PDA inclinado a 30°C por 7 dias. O micélio foi raspado do meio de cultivo com auxílio de uma alça de níquel e então inoculado nos frascos Erlenmeyer contendo MS ou EAPC.

A fermentação foi conduzida a 29 °C e 120 rpm em shaker. Amostras foram retiradas a cada 24 horas para análise de viabilidade celular, biomassa total e concentração de GA₃ durante um período de 240 horas.

2.6.1. Estudo da produção de GA₃ com inóculo preparado em meio alternativo

No cultivo realizado em MS (etapa anterior), após 4 dias de crescimento, foi utilizado o caldo fermentado como inóculo para um novo meio cultivo a base de MS a 2%. O meio líquido foi inserido em Erlenmeyer de 125 mL num volume de 30 mL. A taxa de inoculação utilizada foi de 10% (v/v).

No cultivo realizado em EAPC (etapa anterior), após 4 dias de crescimento, foi utilizado o caldo fermentado como inóculo para um novo meio cultivo a base de EAPC a 5%. O meio líquido foi inserido em Erlenmeyer de 125 mL num volume de 30 mL. A taxa de inoculação utilizada foi de 10% (v/v).

Os meios inoculados foram incubados em *shaker* a 29 °C e 120 rpm. Amostras foram retiradas a cada 24 horas para análise de concentração de biomassa total e concentração de GA₃.

2.7. Extração, análise de GA₃ e biomassa total

O material fermentado foi filtrado para remoção da biomassa e, em seguida, realizou-se uma precipitação para remoção de macromoléculas. Para precipitação foram utilizados 15 mL do filtrado e adicionou-se 5 mL de etanol, 1 mL da solução de Carrez 1 (acetato de zinco a 30%), 1 mL da solução de Carrez 2 (ferrocianeto de potássio a 15%). O volume foi completado para 25 mL com água deionizada. O material foi filtrado para remoção do precipitado e no líquido clarificado foi feita a quantificação de GA₃ (Machado, 2002) (Figura 8).

A determinação de GA₃ nas amostras foi feita pela análise espectrofotométrica a 254 nm (Holbrook, Edge e Baily, 1961). A determinação de biomassa foi realizada pelo método de matéria seca, o qual o material foi seco em estufa a 80 °C até peso constante.

A análise do pH foi realizada pelo método potenciométrico e a concentração de açúcares totais e redutores foram realizadas por meio da metodologia espectrofotométrica a 535 nm (Somogyi, 1937 e Nelson, 1944).

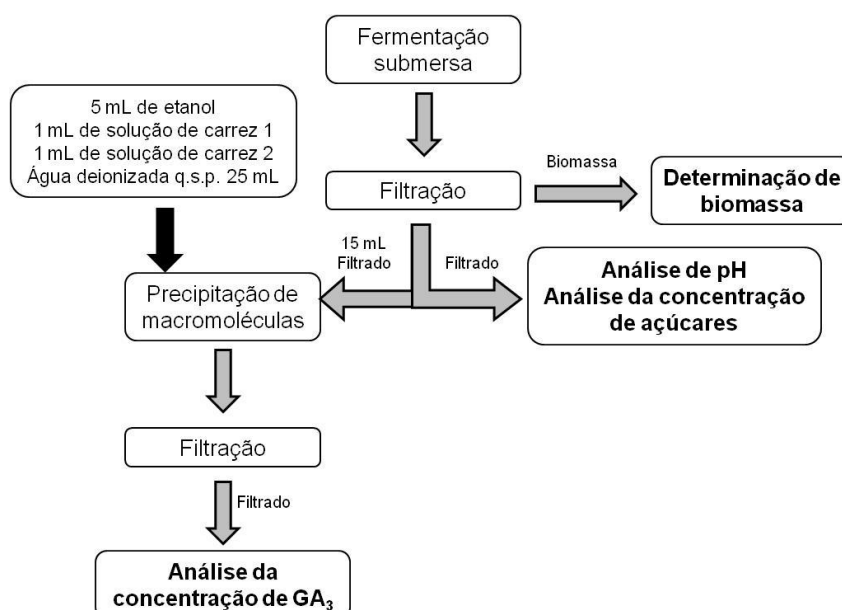


Figura 8. Etapas de extração de GA₃ do fermentado para análise.

LEGENDA: q.s.p. – quantidade suficiente para.

2.8. Viabilidade celular

Das suspensões celulares foi retirado 1 mL e feita a adição de 9 mL de solução salina (cloreto de sódio 0,85%) e, assim, procedeu-se uma diluição seriada até uma diluição de 10^{-6} . 0,1 mL das diluições 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} foram utilizados para cultivo em superfície em placa de Petri contendo PDA. As placas foram incubadas a 30 °C por 24/48 horas.

Após o crescimento nas placas de Petri procedeu-se a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC)/mL (Equação 1).

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{n^{\circ}decol\ ônias \times fator\ de\ dilui\ ç\ ão}{volume\ (mL)} \quad \text{Equação 1}$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Seleção de cepas produtoras de GA₃ por fermentação submersa

Nesse estudo foi conduzida a seleção de cepas com maior capacidade de produção de GA₃ por fermentação submersa em meio sintético ICI. Os resultados das cepas de *G. fujikuroi* e *F. moniliforme* podem ser visualizados na Tabela 13.

Tabela 13. Produção de GA₃ e biomassa por diferentes cepas de *G. fujikuroi* e *F. moniliforme*

Cepa	Tempo (horas)	Biomassa (g/L)	GA₃ (mg/L)	Produtividade GA₃ (mg/L/h)
LPB-02	168	19,6	90,2	0,54
	216	19,0	116,2	0,54
	264	20,5	123,5	0,47
LPB-03	168	10,6	66,0	0,39
	216	11,1	77,9	0,36
	264	14,3	82,3	0,31
LPB-05	168	20,7	89,4	0,53
	216	28,8	108,6	0,50
	264	20,0	88,3	0,33
LPB-06	168	13,5	204,9	1,22
	216	15,0	248,9	1,15
	264	16,2	208,1	0,79
LPB-BCA	168	9,9	14,0	0,08
	216	11,6	21,8	0,10
	264	11,8	37,7	0,14

A cepa *G. fujikuroi* LPB-06 produziu a maior concentração de GA₃, 248,9 mg/L em 216 horas de fermentação. A cepa LPB-02 produziu 123,5 mg/L em 264 horas

de fermentação e a cepa LPB-05 108,6 mg/L em 216 horas. A cepa LPB-BCA foi a que teve a menor produção de GA₃ (37,7 mg/L em 264 horas).

Em relação à biomassa, a cepa LPB-06, a qual apresentou uma maior produção de GA₃, obteve concentração máxima de biomassa de 16,2 g/L em 264 horas de cultivo. A cepa LPB-05 apresentou uma maior produção de biomassa atingindo 28,8 g/L em 216 horas. A cepa que teve o menor crescimento da biomassa foi a LPB-BCA (11,8 g/L), a também qual teve menor produção de GA₃ (37,7 mg/L). Candau, Avalos e Cerda-Olmedo (1992) obtiveram 9 g/L de biomassa em 12 dias de fermentação. Durán-Páramo *et al* (2004) alcançaram uma concentração de biomassa de 3,5 g/L em 12 dias e Uthandi, Karthikeyan e Sabarinathan (2010) obtiveram 8 g/L de biomassa em 8 dias de fermentação.

O resultado de produção de GA₃ pelas cepas de fungos isolados está apresentado na Tabela 14. As cepas H12, H21 e H31 não produziram GA₃. A cepa com melhor produção foi a 3C2 com 37,7 mg/L em 168 horas de fermentação seguida da cepa G22 com 31,6 mg/L em 168 horas de fermentação. Em termos de biomassa, a cepa 3C2 obteve uma concentração máxima de 15,9 em 264 horas de fermentação. A cepa com maior concentração de biomassa foi a H31 com 18,9 g/L em 264 horas de cultivo. A cepa que apresentou um maior crescimento da biomassa foi a 1B, que atingiu 12,6 g/L de biomassa em 264 horas de cultivo.

Tabela 14. Concentração de GA₃ e biomassa com diferentes cepas de fungos isolados pertencentes ao banco de cepas LPB.

Cepa	Tempo (horas)	Biomassa (g/L)	GA₃ (mg/L)	Produtividade GA₃ (mg/L/h)
G22	168	11,6	31,6	0,19
	216	14,4	0,0	0,00
	264	18,2	13,5	0,05
G42	168	11,3	0,0	0,00
	216	11,9	0,0	0,00
	264	16,6	9,3	0,04
H12	168	6,2	0,0	0,00
	216	11,6	0,0	0,00
	264	14,9	0,0	0,00
H21	168	14,3	0,0	0,00
	216	13,0	0,0	0,00
	264	15,2	0,0	0,00
H31	168	16,4	0,0	0,00
	216	16,4	0,0	0,00
	264	18,9	0,0	0,00
3C1	168	15,2	0,0	0,00
	216	12,0	5,9	0,03
	264	18,2	0,0	0,00
3C2	168	10,1	37,7	0,22
	216	15,3	8,4	0,04

Cepa	Tempo (horas)	Biomassa (g/L)	GA₃ (mg/L)	Produtividade GA₃ (mg/L/h)
1B	264	15,9	7,4	0,03
	168	10,3	22,2	0,13
	216	10,9	0,0	0,00
	264	12,6	0,0	0,00

Outros trabalhos demonstraram a produção de GA₃ por fermentação submersa em frascos de Erlenmeyer (Tabela 15). Candau, Avalos e Cerda-Olmedo (1992) e Durán-Páramo *et al.* (2004) obtiveram 150 mg/L e 120 mg/L de GA₃ com a cepa *Gibberella fujikuroi* e utilizando glicose e NH₄NO₃, como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. Ates, Ozenir e Gökdere (2006) estudaram a influencia do óleo de silicone na produção de GA₃. Sem a adição de óleo a produção foi de 130 mg/L e com a adição de óleo foi de 1200 mg/L. Uthandi, Karthikeyan e Sabarinathan (2010) obtiveram 526 mg/L de GA₃ utilizando sacarose e NaNO₃.

Tabela 15. Produção de GA₃ por FSm em frascos de Erlenmeyer conforme a literatura

Cepa	Substrato	GA₃ (mg/L)	Referência
<i>Gibberella fujikuroi</i> IMI58289	Glicose (80 g/L), NH ₄ NO ₃ (1,0 g/L)	150	Candau, Avalos e Cerda-Olmedo, 1992
<i>Gibberella fujikuroi</i> NRRL-2278	Glicose (25 g/L), NH ₄ NO ₃ (1,33 g/L)	120	Durán-Páramo <i>et al.</i> , 2004
<i>Gibberella fujikuroi</i> NRRL-2278	Glicose (40 g/L), Farinha de arroz (2,0 g/L); Óleo de silicone (5%)	1200	Ates, Ozenir e Gökdere, 2006
<i>Gibberella fujikuroi</i> NRRL-2278	Glicose (40 g/L), Farinha de arroz (2,0 g/L)	130	Ates, Ozenir e Gökdere, 2006
<i>Fusarium fujikuroi</i> SG2	Sacarose (30 g/L), NaNO ₃ (3 g/L)	526	Uthandi, Karthikeyan e Sabarinathan, 2010

Após este estudo a cepa *G. fujikuroi* LPB-06 foi escolhida para futuros estudos devido à sua melhor produção de GA₃ em meio ICI. As cepas *G. fujikuroi* LPB-02 e *F. moniliforme* LPB-03 também podem ser consideradas em outros estudos por terem apresentado anteriormente bons resultados de produção de GA₃ em substratos a base de subprodutos da agroindústria (Rodrigues, 2010).

3.2. Estudo da cinética de produção de GA₃ em meio ICI utilizando *G. fujikuroi* LPB-06

Nesse estudo foi realizada uma cinética da produção de GA₃, crescimento de biomassa, pH e consumo de glicose (meio ICI) ao longo do tempo de 264 horas. Os resultados são mostrados na Figura 9.

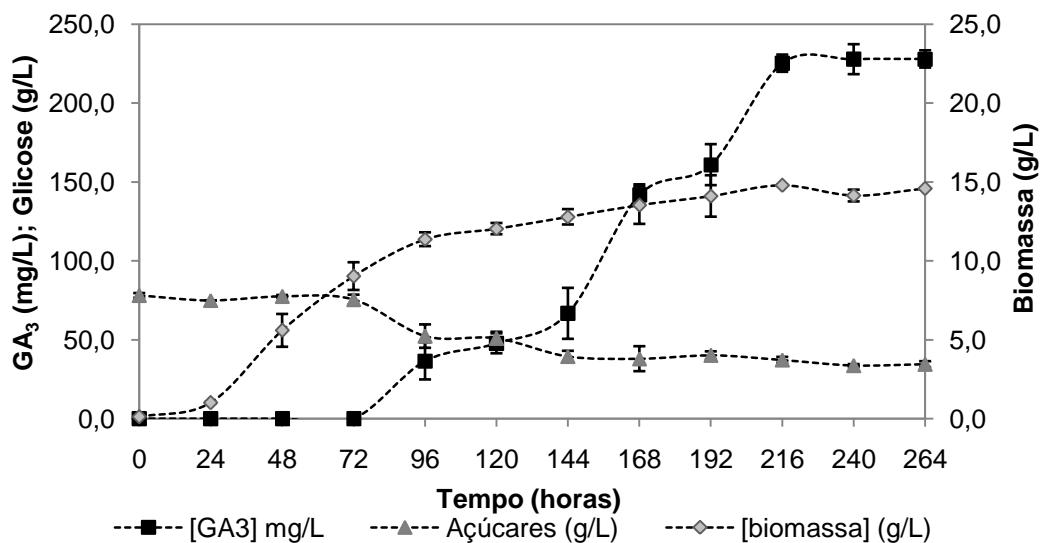


Figura 9. Evolução da produção de GA₃, crescimento de biomassa, pH e consumo de açúcares por *G. fujikuroi* LPB-06

A produção de GA₃ iniciou em torno de 96 horas de fermentação, quando a biomassa se apresentou na fase de desaceleração do crescimento. Por se tratar de um produto de metabolismo secundário do fungo, era esperado que houvesse primeiro o crescimento do fungo e depois a produção de GA₃ (Shukla, Srivastava e Chand, 2003). A maior concentração de GA₃ foi de 235,3 mg/L obtida em 216 horas e, após esse período de cultivo, a concentração de GA₃ manteve-se constante.

A biomassa teve uma fase de adaptação (fase lag) nas primeiras 24 horas. Após 24 horas de cultivo, iniciou a fase exponencial de crescimento (fase log) e nesta fase a reprodução celular encontra-se extremamente ativa. A partir de 96 horas, o crescimento celular teve uma diminuição, iniciando assim a fase estacionária de crescimento que persistiu até o final da fermentação. A concentração máxima de biomassa foi de 14,8 g/L em 216 horas de crescimento. A análise de biomassa realizada foi relativa à biomassa total e não de células viáveis, portanto, não há como garantir que toda biomassa estivesse viável na fase estacionária.

A concentração de glicose teve pouca variação nas primeiras 72 horas de fermentação, de 78,1 g/L para 75,5 g/L. Após o início da produção de GA₃ houve uma diminuição significativa na concentração de glicose indicando que esta fonte de carbono é consumida para a produção de GA₃ assim como para o crescimento do fungo. Ao final da fermentação, a concentração de glicose no meio era de 34,5 g/L, essa quantidade representa 44% em relação à quantidade inicial de glicose,

indicando que somente 56% da glicose contida no meio de cultivo foi consumida após 264 horas de fermentação. Isso representa um rendimento de biomassa em relação à glicose de 33% e rendimento de GA₃ em relação à glicose de 0,5%.

Em relação ao pH, houve pouca variação ao longo da fermentação. O pH teve uma diminuição de 5,0 para 4,3, isso pode ocorrer devido a produção de GA₃, o qual quando presente em solução aquosa diminui o pH. Uthandi, Karthikeyan e Sabarinathan (2010) observaram que, altas produções de GA₃ foram obtidas em fermentações com pH final baixo.

O meio de cultivo sintético ICI é um meio padrão para produção de GA₃, então para melhorar o rendimento da produção de GA₃ são necessários planejamentos de otimização de variáveis físicas e químicas que interferem no processo. Como o objetivo é utilizar um substrato alternativo para produzir o GA₃, não foram realizadas otimizações no meio sintético ICI.

3.3. Seleção de subprodutos da agroindústria como substrato para produção de GA₃

Nesse estudo foi realizada a seleção de substratos para a produção de GA₃. As cepas LPB-02, LPB-03 e LPB-06 foram testadas por terem apresentado bons resultados anteriormente. A Tabela 16 apresenta os resultados da produção de GA₃ em diferentes substratos em 144 e 192 horas de fermentação.

Tabela 16. Resultados da produção de GA₃ em diferentes substratos utilizados neste trabalho.

Experimento	Substrato	LPB-06		LPB-03		LPB-02	
		GA ₃ (mg/L)		GA ₃ (mg/L)		GA ₃ (mg/L)	
		144 horas	192 horas	144 horas	192 horas	144 horas	192 horas
1	EAPC	130,0	114,0	37,2	73,1	17,2	90,7
2	MAN	48,0	0,0	8,3	0,0	0,0	0,0
3	MC	50,0	42,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4	MS	100,0	120,0	15,7	32,0	43,9	0,0
5	VIN	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
6	EAPC e MAN	32,0	43,0	21,3	26,5	0,0	0,0
7	EAPC e MC	31,0	28,0	0,0	0,0	0,0	0,0
8	EAPC e MS	31,0	57,0	18,2	0,0	0,0	0,0
9	EAPC e VIN	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
10	MAN e MC	0,0	83,0	0,0	0,0	0,0	0,0
11	MAN e MS	57,0	53,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12	MAN e VIN	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
13	MC e MS	71,0	70,0	0,0	0,0	0,0	0,0
14	MC e VIN	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
15	MS e VIN	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

A maior produção de GA₃ foi de 130 mg/L (produtividade de 0,9 mg/L/h), utilizando a cepa LPB-06 em EAPC como substrato após 144 horas de fermentação. A mesma cepa produziu 120 mg/L (produtividade de 0,6 mg/L/h) com MS como substrato em 192 horas de fermentação. A mistura entre EAPC e MS apresentou uma produção de 53 mg/L, uma concentração baixa em relação aos substratos utilizados separadamente. As menores produções de GA₃, utilizando a cepa LPB-06, foram obtidas utilizando MAN e MC como substratos, com 48 e 50 mg/L.

Dentre as misturas de substratos utilizadas para a cepa LPB-06, a mistura entre MAN e MC foi a que apresentou melhor produção, 83 mg/L, seguida da mistura MC e MS com 70 mg/L. Utilizando MAN e MC separadamente a produção de GA₃ foi de 48 e 50 mg/L de GA₃, respectivamente. As misturas EAPC e MAN, EPC e MC, MAN e MS apresentaram concentrações baixas de GA₃, 43, 51 e 57 mg/L, respectivamente.

Utilizando a cepa LPB-03, a melhor produção de GA₃ foi de 73,1 mg/L (produtividade de 0,4 mg/L/h), a qual foi obtida com EAPC como substrato. Com MS como substrato, foram produzidas 32 mg/L de GA₃. Utilizando MAN, foi obtida uma produção de 8,3 mg/L em 6 dias de fermentação. Com MC não houve produção de GA₃.

Dentre as misturas de substratos com a cepa LPB-03, a maior produção foi de 26,5 mg/L obtida utilizando EAPC e MAN. A mistura entre EAPC e MS produziu somente 18,2 mg/L. As demais misturas não apresentaram produção de GA₃.

Com a cepa LPB-02, obteve-se uma concentração de 90 mg/L (produtividade de 0,5 mg/L/h) com EAPC e 43,9 mg/L com MS como substrato. Os demais substratos e as misturas entre substratos não tiveram produção de GA₃.

A Tabela 17 apresenta a quantidade de açúcares totais e redutores, nitrogênio e lipídios dos substratos estudados. No EAPC e MS, substratos que favoreceram um maior acúmulo de GA₃, a quantidade de açúcares totais é semelhante (em torno de 8 g/L), a quantidade de nitrogênio no MS é maior que no EAPC (14,8 mg/L e 8,5 mg/L, respectivamente). Tudzynski (1999); Escamilla *et al.* (2000); Rodrigues *et al.* (2011) afirmam que a produção de giberelinas começa quando a quantidade de nitrogênio disponível estiver esgotada. O EAPC por ter uma quantidade menor de nitrogênio que o MS, propicia uma maior produção de GA₃ em um tempo menor, ou seja, tem maior produtividade de GA₃.

O MC possui a menor quantidade de nitrogênio (1,6 mg/L) entre os substratos estudados, resultando assim em uma alta relação entre carbono/nitrogênio (C/N). Esta alta relação C/N não proporcionou maiores acúmulos de GA₃. A MAN possui uma quantidade maior de nitrogênio (32,1 mg/L) e essa quantidade também não favoreceu uma maior produção de GA₃. Quantidades de nitrogênio de 8,5 e 14, 8 mg/L favoreceram uma maior produção de GA₃. Como não foi feita análise de todos os componentes presentes em cada substrato, não se pode afirmar que somente a quantidade de açúcares e nitrogênio influenciou na produção do GA₃.

A VIN, mesmo com a maior quantidade de nitrogênio disponível, não foi um bom substrato para *G. fujikuroi* e *F. moniliforme*, pois não foi observado crescimento do fungo LPB-02, LPB-03 e LPB-06. A mistura da VIN com outros substratos também não favoreceu o crescimento do fungo.

Além de açúcares, nitrogênio e lipídios, outros compostos podem interferir no crescimento do fungo e na produção de GA₃, os quais não foram analisados neste trabalho.

Tabela 17. Quantidade de açúcares, nitrogênio e lipídios dos substratos estudados

	EAPC (5%)	MC (1%)	MS (2%)	MAN (30%)	VIN (50%)
Açúcares Totais (g/L)	8	8,0	7,9	8,1	0,21
Açúcares Redutores (g/L)	2,3	0,4	0,7	5,6	0,05
Nitrogênio (mg/L)	8,5	1,6	14,8	32,1	88,5
Lipídios	0,85	0,18	8,15	0,79	0,72

Rodrigues (2010), utilizando PC como substrato em fermentação no estado sólido (FES), obteve 7,6 g de GA₃/kg de PC seca com a cepa *Fusarium moniliforme* LPB-03. A maior produção de GA₃ nesse estudo foi obtida utilizando o EAPC como substrato, a qual foi de 130 mg/L (2,6 g de GA₃/kg de PC seca), confirmando que a PC foi um bom substrato para produção de GA₃.

Após este estudo, foram selecionados a cepa *Gibberella fujikuroi* LPB-06 e os substratos EAPC e o MS para os estudos posteriores de produção de GA₃.

3.4. Estudo do preparo do inóculo

Após a seleção da cepa LPB-06 e dos substratos MS e EAPC para produção de GA₃, foi realizado um estudo cinético para o preparo de inóculo. Este estudo consistiu na avaliação do crescimento da biomassa utilizando os substratos MS e EPC e teve como objetivo identificar com qual substrato a cepa se desenvolveria

melhor, em menor tempo e, conseqüentemente, propiciasse uma melhor produção de GA₃.

A Figura 10 apresenta a comparação entre a cinética de viabilidade celular da cepa *G. fujikuroi* LPB-06 em MS e EAPC.

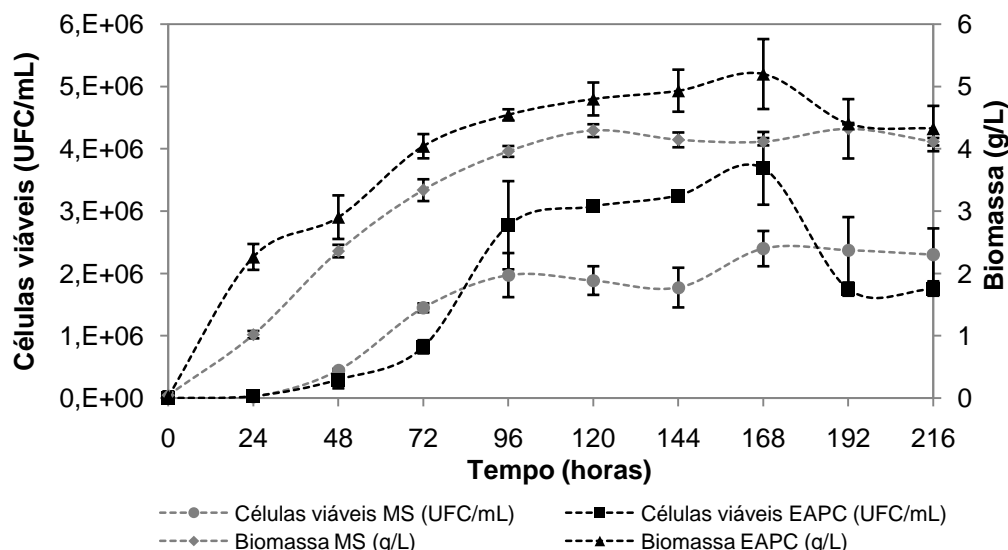


Figura 10. Cinética de viabilidade celular em MS a 2 % e EAPC a 5 %.

Legenda: 1,0E+06 significa $1,0 \times 10^6$

O estudo de preparo de inóculo em MS a 2% mostra que, em termos de viabilidade celular, em 24 horas a cepa apresentou crescimento celular ($9,8 \times 10^2$ para $2,38 \times 10^5$ UFC/mL), ou seja, o fungo apresentou fase lag (adaptação) inferior a 24 horas. Após esse período inicia-se a fase exponencial de crescimento do fungo, a qual permaneceu até 96 horas e o número de células viáveis atingiu 2×10^6 UFC/mL. Após esse período inicia-se a fase estacionária de crescimento em que as células viáveis ficaram em torno de 2×10^6 UFC/mL. A biomassa total nesse período ficou em torno de 4 g/L.

Desta forma, o tempo de crescimento do inóculo em MS, antes de ser inoculado ou transferido ao meio de produção de GA₃ a base de MS, foi definido em 96 horas, pois representa a máxima viabilidade celular antes da biomassa iniciar a fase estacionária de crescimento.

No estudo de preparo de inóculo realizado em EAPC, observa-se que o fungo iniciou seu crescimento nas primeiras 24 horas ($4,19 \times 10^2$ para $3,50 \times 10^4$ UFC/mL). O período entre 24 e 96 horas corresponde ao período exponencial de crescimento do

fungo. Em 96 horas a viabilidade celular corresponde a $2,78 \times 10^6$ UFC/mL e a biomassa total corresponde a 4,55 g/L. Após 96 horas de fermentação, a biomassa desacelerou seu crescimento e iniciou a fase estacionária. Nessa fase, a viabilidade celular fica em torno de 3×10^6 UFC/mL e após 192 horas há uma queda na quantidade de células viáveis indicando assim que as células estão morrendo.

Portanto, no estudo realizado em EAPC, foi definido que o melhor tempo para crescimento da cepa é de 96 horas. Esse é o período em que a cepa permanece na fase exponencial de crescimento e pode ser utilizado para inocular um novo meio de cultivo a base de EAPC para produção de GA₃.

Estudo da produção de GA₃ com inóculo preparado em meio alternativo

Utilizando MS como substrato, foi realizada uma cinética de produção de GA₃ (Figura 11). Foi utilizado o inóculo desenvolvido em MS em 96 horas de incubação e a taxa de inoculação utilizada foi de 10 % (2×10^5 UFC/mL de células viáveis).

Antes do estudo de preparo de inóculo, a produção de GA₃ inicia-se em um período entre 48 e 72 horas de fermentação. A concentração de GA₃ aumenta até 144 horas (100,7 mg/L), após esse período observa-se uma queda na concentração de GA₃ até 168 horas e então, a concentração aumenta até 216 horas, em que atinge uma concentração de 130,8 mg/L (produtividade de 0,60 mg/L/h).

Após o estudo de preparo de inóculo, observa-se que a produção de GA₃ inicia em um período entre 48 e 72 horas e a concentração de GA₃ aumenta até 144 horas de fermentação (130,8 mg/L e produtividade de 0,91 mg/L/h). Após 144 de fermentação há uma queda na concentração de GA₃.

Comparando a produção de GA₃ antes e depois do estudo do preparo de inóculo em MS, observa-se que não há alteração da concentração máxima de GA₃ obtida, mas há alteração no tempo em que essa máxima concentração de GA₃ é atingida, ou seja, ocorreu um aumento da produtividade do processo. Antes do estudo do inóculo, a concentração máxima de GA₃ foi atingida em 216 horas e, após o estudo do inóculo e utilizando uma taxa de inoculação de 10%, a máxima concentração de GA₃ foi atingida em 144 horas de fermentação, ou seja, houve um ganho de produtividade de 72 horas.

Em termos de biomassa, antes do estudo de preparo do inóculo, observa-se que houve crescimento da cepa em 24 horas de cultivo e que a fase lag é inferior a 24 horas. Após esse período a fase exponencial de crescimento da cepa inicia, a

qual permanece até 96 horas em que atinge 3,96 g/L. Após esse período inicia-se a fase estacionária de crescimento em que a biomassa total permanece em torno de 4 g/L.

Após o estudo de preparo do inóculo, observa-se que a cepa tem uma fase lag inferior a 24 horas e que a fase exponencial da cepa dura até 48 horas em que atinge 4,41 g/L de biomassa total. Após 48 horas de cultivo, iniciou a fase estacionária de crescimento da biomassa.

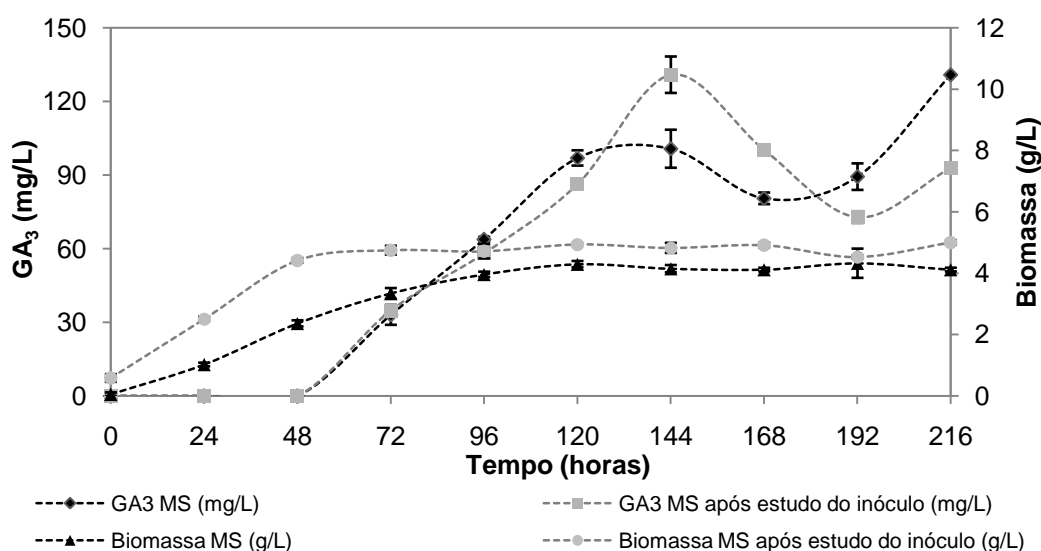


Figura 11. Cinética de produção de GA₃ em meio a base de MS a 2 % antes e depois do estudo de preparo do inóculo.

Utilizando o EAPC como substrato, foi realizada uma cinética de produção de GA₃ (Figura 12). O inóculo foi desenvolvido em meio à base de EAPC após 96 horas de incubação e a taxa de inoculação utilizada foi de 10 % ($2,7 \times 10^5$ UFC/mL de células viáveis).

Antes do estudo de preparo de inóculo, observa-se que a produção de GA₃ inicia em um período entre 48 e 72 horas de fermentação. A concentração máxima de GA₃ é atingida em 168 horas de cultivo (121,8 mg/L).

Após o estudo de preparo de inóculo, observa-se que a produção de GA₃ inicia em um período entre 24 e 48 horas de cultivo, ou seja, inicia em um tempo menor se comparado a produção antes do estudo do inóculo. A concentração de GA₃ aumenta até 120 horas de fermentação, ponto em que há a máxima

concentração de GA₃ (149,4 mg/L) e produtividade de 1,2 mg/L/h. Após 120 horas de fermentação há uma queda na concentração de GA₃.

Comparando a produção de GA₃ antes e depois do estudo do preparo de inóculo em EAPC, observa-se que a concentração máxima de GA₃ obtida aumenta de 121,8 mg/L para 149,4 mg/L e o tempo em que essa concentração máxima é obtida diminuiu de 168 horas para 120 horas, ou seja, a produtividade aumentou de 0,7 mg/L/h para 1,2 mg/L/h. Após o estudo do preparo de inóculo, houve um ganho de produção de 18 mg/L (22%) e de produtividade 0,5 mg/L/h (diminuição no tempo de produção de GA₃ de 48 horas).

Em termos de biomassa, antes do estudo de preparo do inóculo, observa-se que houve crescimento da cepa em 24 horas de cultivo e que a fase lag é inferior a 24 horas. Após esse período inicia a fase exponencial de crescimento da cepa, a qual permanece até 96 horas em que atinge 4,55 g/L. Após esse período, a cepa inicia a fase estacionária de crescimento.

Após o estudo de preparo do inóculo, observa-se que a cepa tem uma fase lag inferior a 24 horas e que a fase exponencial da cepa dura até 72 horas em que atinge 3,93 g/L de biomassa total. Após 72 horas de cultivo, a biomassa inicia a fase estacionária de crescimento.

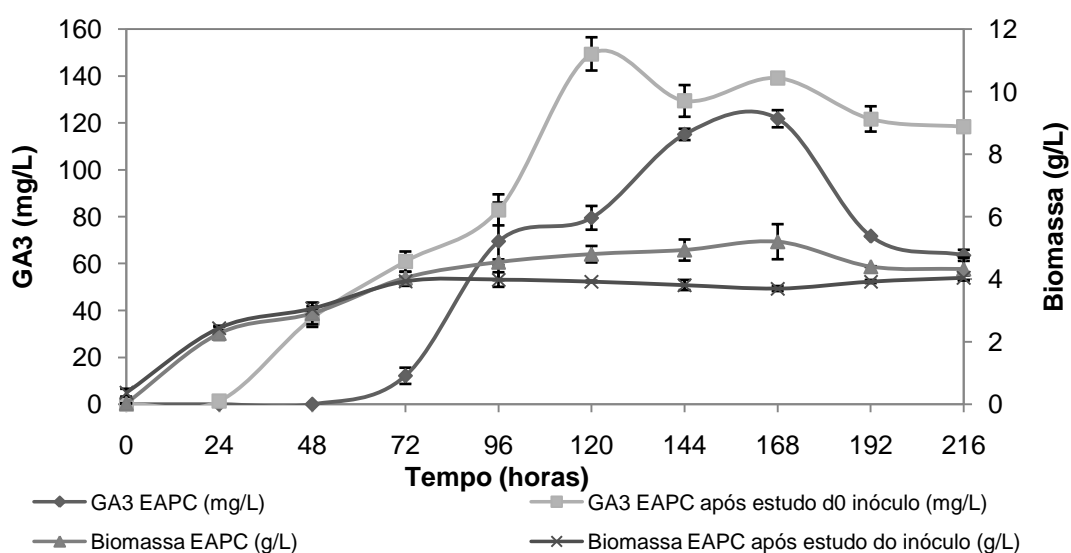


Figura 12. Cinética de produção de GA₃ em meio à base de EAPC a 5 % antes e depois do estudo do preparo de inóculo.

Ao comparar o estudo de preparo de inóculo entre o MS e o EAPC, observa-se que a produção de GA₃ foi maior em EAPC do que em MS, 150 mg/L e 130 mg/L respectivamente. O tempo de máxima produção de GA₃ obtida em EAPC (120 horas) foi menor que em MS (144 horas). Essa diferença pode ser justificada pelos componentes presentes em cada substrato, os açúcares presentes em cada substratos são diferentes e a quantidade de nitrogênio presente no EAPC é menor que a quantidade presente no MS.

De acordo com os resultados do estudo do preparo de inóculo, o EAPC foi escolhido como substrato para dar sequencia nos estudos de produção de GA₃.

4. CONCLUSÃO

A cepa *Gibberella fujikuroi* LPB-06 foi selecionada como maior produtora de GA₃ em meio líquido sintético ICI, 248,9 mg/L de GA₃ (produtividade de 1,1 mg/L/h) em 216 horas de fermentação.

O EAPC e o MS foram selecionados como substratos para a produção de GA₃ utilizando a cepa *Gibberella fujikuroi* LPB-06. Em EAPC, a produção de GA₃ foi de 130 mg/L (produtividade de 0,9 mg/L/h) em 144 horas de cultivo e, em MS a produção foi de 120 mg/L (produtividade de 0,6 mg/L/h) em 192 horas.

Após o estudo da preparação de inóculo, o EAPC foi selecionado como substrato para produção de GA₃ por fermentação submersa. A maior produção obtida foi de 150 mg/L (produtividade de 1,2 mg/L/h) em 120 horas (5 dias) de fermentação. A produtividade de GA₃ obtida em EAPC é superior a produtividade obtida em meio sintético ICI, o que justifica a utilização deste subproduto da agroindústria no processo de produção de GA₃.

CAPÍTULO 2

OTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS FÍSICAS E QUÍMICAS DA PRODUÇÃO DE GA₃ POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA E NO ESTADO SEMISSÓLIDO UTILIZANDO POLPA CÍTRICA

RESUMO

A otimização de formulação de produtos e processos leva a uma busca por técnicas de planejamento de experimentos, que visa à redução do número de experiências ou repetições e a melhora da qualidade da informação obtida através dos resultados. Para otimizar a produção de GA₃ por fermentação submersa em extrato aquoso de polpa cítrica (EAPC) e por fermentação no estado semissólido na suspensão de polpa cítrica (SPC) foram utilizados planejamentos experimentais estatísticos. Para a fermentação submersa com EAPC, além de realizada seleção de nutrientes a serem adicionados ao EAPC, foram otimizadas as seguintes variáveis: taxa de inóculo, pH e quantidade de PC no extrato. Em fermentação no estado semissólido com SPC foram otimizados: a quantidade de PC na suspensão e o tamanho da partícula, assim como foram selecionados nutrientes a serem adicionados. As maiores concentrações de GA₃ (320 mg/L ou 3,7 g de GA₃/kg de PC seca) em fermentação submersa foram obtidas utilizando EAPC 10% (10% de PC seca no extrato), pH 5,5 (natural da PC), 10% de taxa de inóculo e 0,5 g/L de MgSO₄. Em fermentação no estado semissólido utilizando SPC, a maior concentração de GA₃ obtida foi de 331 mg/L (7,7 g de GA₃/kg de PC seca) utilizando 5% de PC no SPC, tamanho da partícula de PC de 2 a 2,8 mm, 20 g/L de sacarose e 0,6 g/L de uréia.

Palavras-chave: Ácido giberélico, polpa cítrica, fermentação submersa, fermentação no estado semissólido, planejamento experimental.

1. INTRODUÇÃO

A necessidade de otimização de processos e produtos leva a uma busca por técnicas de planejamento de experimentos, minimizando custos e tempo e, maximizando rendimento, produtividade e a qualidade do produto (Rodrigues e lemma, 2005).

A utilização de planejamento experimental propicia a avaliação dos efeitos que as variáveis independentes têm sobre as respostas e, envolve combinação

entre duas ou mais variáveis independentes. Uma vantagem do planejamento experimental é a redução do número de experiências ou repetições e a melhora da qualidade da informação obtida através dos resultados. Nos planejamentos experimentais, várias estratégias podem ser utilizadas, desde delineamentos fatoriais fracionados ou os de Plackett & Burman (PB), excelentes para uma avaliação prévia e seleção dos diversos níveis das variáveis, até o delineamento composto central rotacional (DCCR) (Rodrigues e lemma, 2005).

O GA₃ pode ser obtido através da fermentação submersa (FSm), da fermentação no estado sólido (FES) e da fermentação no estado semissólido (FESS). A FSm apresenta diversas vantagens, tais como facilidade operacional, economia, reduzido espaço e preciso controle de parâmetros operacionais (Kumar & Lonsane, 1989). A FES é caracterizada pelo desenvolvimento do microrganismo em um ambiente com baixa atividade de água, sobre e no interior de partículas porosas úmidas denominadas suporte ou matriz sólida (Pandey, 2003; Singhania *et al.*, 2009). A FESS é uma técnica de fermentação semelhante à FES em um meio contendo líquido livre, ou seja, não exige o pré-tratamento físico e ou químico do substrato a ser utilizado. A técnica permite uma melhor e mais fácil recuperação dos produtos solubilizados (Rodriguez Couto, Dominguez e Sanroman, 2001).

Os fatores que podem influenciar na produção do GA₃ são o pH, a temperatura, a aeração, agitação, a taxa de inoculação do fungo, o tamanho dos grãos de substrato e presença ou ausência de nutrientes no meio. Neste trabalho foram estudadas as variáveis pH, taxa de inoculação, quantidade de PC presente no extrato aquoso de PC e na suspensão de PC, tamanho dos grãos de PC e presença de nutrientes adicionais a PC. Foram aplicados planejamentos experimentais do tipo DCCR e Plackett & Burman para otimização das condições físicas e químicas do processo de produção de GA₃. Tanto para a FSm como para a FESS foram aplicadas as etapas de otimização das variáveis físicas e químicas e otimização dos nutrientes a serem adicionados a PC para produção de GA₃.

O objetivo desta etapa do trabalho foi otimizar as variáveis físicas e as variáveis químicas por fermentação submersa e por fermentação no estado semissólido para produzir GA₃.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismos

O microrganismo utilizado no presente trabalho foi a *Gibberella fujikuroi* LPB-06, obtida do banco de cepas do Laboratório de Processos Biotecnológicos I (LPB-I), da Divisão de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, da Universidade Federal do Paraná, a qual foi selecionada em estudos prévios como ótima produtora de GA₃.

A cepa foi mantida em meio PDA (*Potato Dextrose Agar*) a 4 °C e foi repicada para um novo meio de cultivo a cada 3 meses.

2.2. Substratos

A polpa cítrica (PC), um subproduto da agroindústria brasileira proveniente do processo de suco de laranja, foi empregada como substrato na produção de GA₃. A PC foi fornecida pela empresa Coalma Comércio de Produtos para Alimentação Animal, na forma de *pellets*, os quais foram triturados e classificados de forma a se obter um tamanho de partícula menor que 5 mm. A PC foi mantida na forma sólida a temperatura ambiente.

O extrato aquoso de polpa cítrica (EAPC) foi preparado no momento do uso. O EAPC é obtido utilizando 5 g de PC moída em 50 mL de água. Essa suspensão é levada a ebulição por 30 minutos em banho-maria e, então, filtrada para remoção dos sólidos suspensos (Rodrigues, 2010).

Com a PC também foi preparado uma suspensão de PC (SPC), o qual foi utilizado na fermentação no estado semissólido (FESS). A SPC foi obtida misturando 5 g de PC com 100 mL de água deionizada. Essa suspensão foi esterilizada em autoclave por 15 minutos a 121 °C.

2.3. Produção do Inóculo de *G. fujikuroi* LPB-06

A cepa de *G. fujikuroi* LPB-06 foi cultivada em tubo de ensaio contendo meio PDA inclinado e incubada a 30 °C por 7 dias. O micélio foi raspado do meio de cultivo com auxílio de uma alça de níquel e então inoculado nos frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio a base de EAPC a 5%. O cultivo foi conduzido a 29 °C sob agitação de 120 rpm por 96 horas.

2.4. Otimização das variáveis físicas e químicas em extrato aquoso de polpa cítrica (EAPC) para fermentação submersa

2.4.1. Otimização das variáveis físicas e químicas para produção de GA₃ por fermentação submersa

As variáveis estudadas nesta etapa do processo foram: taxa de inóculo, quantidade de PC no extrato aquoso e pH. Para a primeira otimização foi realizado um planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR) 2³ com 8 ensaios, 6 ensaios nos pontos axiais e mais 3 ensaios nas condições de ponto central, totalizando 17 ensaios (Rodrigues e lemma, 2005). Os níveis utilizados para cada variável estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Planejamento experimental tipo DCCR 2³ para as variáveis taxa de inóculo, quantidade de PC e pH estudadas em FSm

Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Taxa de inóculo	5%	7%	10%	13%	15%
Quantidade de PC no extrato	2%	3,2%	5%	6,8%	8%
pH	4,00	4,66	5,00	5,34	6,00

O meio EAPC foi acondicionado em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo, o qual foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos. A fermentação foi conduzida a 29 °C sob agitação de 120 rpm. Amostras foram retiradas após 120 horas de fermentação para análise de GA₃.

A segunda otimização das variáveis físicas e químicas foi realizada com suporte de um planejamento experimental do tipo DCCR 2² com 4 ensaios, 4 ensaios nos pontos axiais e mais 3 ensaios nas condições de ponto central, totalizando 11 ensaios. As variáveis estudadas foram a quantidade de PC no extrato aquoso e o pH. Os níveis utilizados estão apresentados na Tabela 19. A variável taxa de inóculo, anteriormente estudada, não foi utilizada nesse estudo porque não se mostrou estatisticamente significativa para produção de GA₃, sendo mantida em 10% nos estudos posteriores.

Tabela 19. Planejamento experimental do tipo DCCR 2² para as variáveis pH e quantidade de PC no extrato estudadas em FSm

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
pH	5	5,44	6,5	7,56	8
Quantidade de PC no extrato (%)	8	9,74	14	18,26	20

2.4.2. Adição de nutrientes ao EAPC

2.4.2.1. Adição de fonte de carbono e fonte de nitrogênio suplementares no EAPC (*one factor at a time*).

Para a etapa de seleção de nutrientes a serem adicionados ao EAPC, foram escolhidos nutrientes presentes no meio sintético ICI (utilizado na etapa de seleção de cepas produtoras de GA₃ – Capítulo 1). A fonte de carbono do meio ICI é a glicose, na concentração de 80 g/L, e a fonte de nitrogênio é o NH₄NO₃, na concentração de 1 g/L. Para este estudo, além das fontes de carbono e nitrogênio presentes no meio ICI, foram utilizadas outras fontes tais como sacarose e amido, como fonte de carbono e NH₄Cl e uréia, como fonte de nitrogênio.

No EAPC a 10% a quantidade de açúcares totais é de 20 g/L, portanto, a quantidade adicionada de cada fonte de carbono foi proporcional em relação a quantidade de carbono e foi complementar até completar 80 g/L de açúcares. As quantidades de cada fonte de carbono adicionadas ao EAPC a 10% foram: 60 g/L de glicose, 30 g/L de sacarose e 60 g/L de amido.

As quantidades de cada fonte de nitrogênio adicionadas ao EAPC foram: 1 g/L de NH₄NO₃, 0,93 g/L de NH₄Cl e 0,75 g/L de uréia. A quantidade de cada fonte foi padronizada em termos da quantidade de N (nitrogênio) no meio. Foram feitas triplicatas de cada fonte e de um controle, ou seja, sem a adição de fonte de carbono nem nitrogênio, resultando em 21 experimentos (

Tabela 20).

Tabela 20. Suplementação de fonte de carbono e de nitrogênio ao EAPC (*one factor at a time*) para a produção de GA₃ por FSM

Fonte	Quantidade adicionada ao EAPC (g/L)
Glicose	60
Sacarose	30
Amido	60
NH ₄ NO ₃	1,00
NH ₄ Cl	0,93
Uréia	0,75
Controle	0

O meio foi acondicionado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo e, foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

A fermentação foi conduzida com taxa de inoculação de 10% (v/v), a 29 °C sob agitação de 120 rpm. Amostras foram retiradas após 120 horas de fermentação para análise de GA₃ produzido.

2.4.2.2. Seleção de nutrientes adicionados ao EAPC

A seleção de nutrientes foi realizada utilizando componentes do meio sintético ICI, e a fonte de carbono e de nitrogênio selecionados na etapa anterior. Os nutrientes utilizados foram: sacarose, uréia, KH₂PO₄, MgSO₄, (NH₄)₂Fe(SO₄)₂, MnSO₄, H₃BO₃, Na₂MoO₄. O planejamento utilizado foi do tipo Plackett & Burman (PB) de 8 variáveis, com 12 ensaios e 3 repetições no ponto central. Os níveis de cada variável estão apresentados na Tabela 21.

O meio (EAPC a 10% (base seca) m/v) foi acondicionado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo e, foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

A fermentação foi conduzida com taxa de inoculação de 10%, a 29 °C sob agitação de 120 rpm. Amostras foram retiradas após 120 horas de fermentação para análise de GA₃.

Tabela 21. Planejamento tipo Plackett & Burman para seleção de sais a serem adicionados ao EAPC

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Sacarose	0	30	60
Uréia	0	0,375	0,75
MgSO ₄	0	0,5	1
KH ₂ PO ₄	0	2,5	5
(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂	0	0,01	0,02
MnSO ₄	0	0,0005	0,001
H ₃ BO ₃	0	0,0005	0,001
Na ₂ MoO ₄	0	0,0005	0,001

2.4.2.3. Determinação da melhor concentração de MgSO₄ para produção de GA₃.

Nesse estudo foi determinado a melhor concentração de MgSO₄ adicionado ao EAPC a 10% (base seca) (m/v) para produção de GA₃, o qual foi escolhido na etapa anterior por influenciar significativamente na produção de GA₃. As concentrações utilizadas de MgSO₄ foram: 0,5 g/L, 1,0 g/L, 1,5 g/L e 2,0 g/L. Uma condição controle também foi analisada, sem a adição de MgSO₄. Os experimentos foram conduzidos em triplicata, totalizando 15 experimentos.

O meio foi acondicionado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo e, foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

A fermentação foi conduzida com taxa de inoculação de 10% (v/v), a 29 °C sob agitação de 120 rpm. Amostras foram retiradas após 120 horas de fermentação para análise do GA₃ produzido.

2.4.3. Cinética de produção de GA₃ em EAPC utilizando *Gibberella fujikuroi* LPB-06

Foi realizado o estudo da cinética de produção de GA₃ em meio EAPC otimizado. As condições de fermentação utilizadas foram: EAPC preparado a 10% (m/v) com 0,5 g/L de MgSO₄ e pH 5,5. O meio foi acondicionado em frascos de Erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de meio e foi esterilizado a 121°C por 15 minutos. A fermentação foi conduzida com taxa de inoculação de 10% (v/v), a 29 °C sob agitação de 120 rpm. Amostras foram retiradas a cada 24 horas para análise da concentração de GA₃, biomassa, pH e açúcares totais e redutores.

2.5. Otimização das variáveis físicas e químicas em FESS para a produção de GA₃

2.5.1. Planejamento experimental para otimização do tamanho da partícula e quantidade de PC na SPC

As variáveis envolvidas neste planejamento experimental foram: quantidade de PC na SPC e tamanho da partícula da PC. Foi realizado um planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR) 2² com 4 ensaios, 4 ensaios nos pontos axiais e mais 3 ensaios nas condições de ponto central, totalizando 11 experimentos (Rodrigues e lemma, 2005). Os níveis utilizados para cada variável estão apresentados na Tabela 22.

Tabela 22. Planejamento experimental (DCCR) para o estudo da influência das variáveis tamanho da partícula e quantidade de PC sobre a produção de GA₃ em FESS

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Tamanho da partícula (mm)	Menor que 0,85	Entre 0,85-2	Entre 2-2,8	Entre 2,8-4	Maior que 4
Quantidade de PC (%)	3,18	4	6	8	8,82

O meio foi acondicionado em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultivo e, foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

A fermentação foi conduzida com taxa de inoculação de 10% (v/v), a 29°C sob agitação de 120 rpm. Amostras foram retiradas após 120 horas de fermentação para análise de GA₃.

2.5.2. Adição de nutrientes a SPC

2.5.2.1. Seleção de nutrientes adicionados a SPC

A seleção de nutrientes foi realizada utilizando a fonte de carbono e de nitrogênio selecionados na etapa 2.1.2.1 e componentes de acordo com o meio sintético ICI. Os nutrientes empregados foram: sacarose, uréia, KH₂PO₄, MgSO₄, (NH₄)₂Fe(SO₄)₂, MnSO₄, H₃BO₃, Na₂MoO₄. O planejamento do tipo Plackett & Burman (PB) com 8 variáveis, 12 ensaios e 3 repetições no ponto central foi empregado nesta etapa. Os níveis de cada variável estão apresentados na Tabela 23.

A fermentação foi conduzida em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de SPC a 5% (m/v), 10% (v/v) de taxa de inóculo, a 29 °C, agitação de 120 rpm por 120 horas.

Tabela 23. Níveis e variáveis estudadas no planejamento estatístico (Plackett & Burman) para seleção de nutrientes a serem adicionados a SPC

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Sacarose (g/L)	0	10	20
Uréia (g/L)	0	0,375	0,75
MgSO ₄ (g/L)	0	0,5	1
KH ₂ PO ₄ (g/L)	0	2,5	5
(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ (g/L)	0	0,01	0,02
MnSO ₄ (g/L)	0	0,0005	0,001
H ₃ BO ₃ (g/L)	0	0,0005	0,001
NaMoO ₄ (g/L)	0	0,0005	0,001

2.5.2.2. Otimização da concentração de sacarose e uréia adicionadas a SPC para produção de GA₃.

A otimização da concentração de sacarose e uréia adicionadas a SPC foi baseada em um planejamento experimental do tipo delineamento composto central

rotacional (DCCR) 2^2 com 4 ensaios, 4 ensaios nos pontos axiais e mais 3 ensaios nas condições de ponto central, totalizando 11 experimentos (Rodrigues e lemma, 2005) (Tabela 24).

A fermentação foi conduzida em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de SPC a 5% (m/v), 10% (v/v) de taxa de inóculo, a 29 °C, agitação de 120 rpm por 120 horas.

Tabela 24. Planejamento experimental (DCCR) para otimização das concentrações de sacarose e ureia em FESS.

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Sacarose (g/L)	5,9	10	20	30	34,1
Uréia (g/L)	0,6	0,75	1,13	1,5	1,65

2.5.3. Cinética de produção de GA₃ por FESS

Realizou-se um estudo da cinética da produção de GA₃ em SPC. As condições de fermentação utilizadas foram: 100 mL de meio a base de SPC a 5% (m/v) adicionado de 20 g/L de sacarose e 0,6 g/L de uréia, pH 5,0. A fermentação foi conduzida em frascos de Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo e taxa de inoculação de 10% (v/v), a 29 °C sob agitação de 120 rpm.

Amostras foram retiradas a cada 24 horas para análise da concentração de GA₃ produzido, concentração de biomassa pelo método de dosagem de ergosterol, pH e açúcares totais e redutores.

2.6. Análises

Nas amostras de FSm e FESS, o procedimento para extração de GA₃ foi realizado por procedimento descrito no Capítulo 1 (seção 2.7).

A determinação de GA₃ nas amostras foi conduzida pela análise espectrofotométrica a 254 nm (Holbrook, Edge e Baily, 1961).

A análise do pH foi realizado pelo método potenciométrico, e as análises da concentração de açúcares totais e redutores foram realizadas pela metodologia espectrofotométrica a 535 nm (Somogyi, 1937 e Nelson, 1944).

A determinação de biomassa nas amostras de FSm ocorreu através do método de matéria seca, o qual o material foi seco em estufa a 80°C até peso constante.

Para a determinação da concentração de biomassa nas amostras da SPC, utilizou-se a metodologia de dosagem do ergosterol presente na membrana do fungo, o qual foi extraído em hexano e analisado por CLAE (Carvalho *et al.*, 2006).

2.7. Análise estatística

Os resultados dos planejamentos experimentais foram analisados pelo Software Statistica 5.0 (StatSoft, Tulsa, OK, EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Otimização das variáveis físicas e químicas da produção de GA₃ por fermentação submersa (FSm)

A otimização da produção de GA₃ por FSm utilizando o extrato aquoso de polpa cítrica (EAPC), foi conduzida em três etapas. Primeiramente, foram conduzidas etapas de otimização de variáveis físicas e químicas significativas ao processo de produção do metabólito – Planejamentos Experimentais do tipo DCCR. Em seguida, uma seleção de componentes a serem adicionados ao meio foi realizada – Planejamento do tipo Plackett & Burman.

3.1.1. Otimização das variáveis físicas e químicas para produção de GA₃ por FSm

Na Tabela 25 estão apresentados os resultados do planejamento experimental do tipo DCCR para otimização das variáveis físicas e químicas. A melhor produção de GA₃ de 230,2 mg/L foi obtida utilizando 7% de taxa de inóculo, 6,8% (m/v) de PC no extrato e pH 5,34 (ensaio 7). Em torno de 209 mg/L de GA₃ foram obtidos nos ensaios 4 (13% de taxa de inóculo (v/v), 6,8% de PC no extrato e pH 4,66), 8 (13% (v/v) de taxa de inóculo, 6,8% de PC no extrato e pH 5,34) e 12 (10% (v/v) de taxa de inóculo, 8% de PC no extrato e pH 5).

As menores concentrações de GA₃, 66,9 mg/L e 80,8 mg/L, foram obtidas nos ensaios 10 (15% (v/v) de taxa de inóculo, 5% (m/v) de PC no extrato e pH 5) e 2 (13% (v/v) de taxa de inóculo, 3,2% (m/v) de PC no extrato e pH 4,66), respectivamente.

Tabela 25. Resultados do planejamento experimental DCCR para otimização das variáveis: taxa de inoculação, quantidade de PC no extrato e pH em FSm

<i>Ensaio</i>	<i>Taxa de inoculação (%)</i>	<i>Quantidade de PC (%)</i>	<i>pH</i>	<i>GA₃ (mg/L)</i>
1	7	3,2	4,66	98,7
2	13	3,2	4,66	80,8
3	7	6,8	4,66	159,2
4	13	6,8	4,66	208,3
5	7	3,2	5,34	128,1
6	13	3,2	5,34	114,8
7	7	6,8	5,34	230,2
8	13	6,8	5,34	209,8
9	5	5,0	5,00	137,9
10	15	5,0	5,00	66,9
11	10	2,0	5,00	119,4
12	10	8,0	5,00	208,8
13	10	5,0	4,00	91,7
14	10	5,0	6,00	193,8
15	10	5,0	5,00	143,7
16	10	5,0	5,00	124,6
17	10	5,0	5,00	183,5

Com os dados é possível verificar quais variáveis têm influência significativa, em um nível de significância de 5% na produção de GA₃. Uma maneira de avaliar os dados obtidos é através da análise de variância (ANOVA), representada pelo coeficiente de determinação (R^2). O melhor valor para R^2 é 1, e ele só ocorrerá se não houver resíduo algum, e portanto, toda a variação em torno da média for explicada pela regressão (Barros Neto, Scarmínio e Bruns, 1995). A ANOVA para o planejamento DCCR é apresentada na Tabela 26, o R^2 obtido é 0,79, o qual é aceitável para um planejamento experimental do tipo DCCR.

Conforme a ANOVA, as variáveis que são significativas dentro dos níveis estudados são a quantidade de PC no extrato e o pH e estas relações são diretamente proporcionais. A taxa de inóculo, não apresentou significância dentro da faixa estudada. Nesse tipo de experimento, a interação entre as variáveis pode ser estimada e de acordo com a ANOVA, as interações entre as variáveis não são significativas.

Tabela 26. ANOVA dos resultados do planejamento experimental do tipo DCCR para as variáveis taxa de inoculação, pH e quantidade de PC em FSm.

<i>Fator</i>	<i>Soma dos quadrados</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Médias quadradas</i>	<i>Razão F</i>	<i>Razão p</i>
(1) Taxa de inóculo (L)	32,01844	1	32,01844	0,016927	0,900143
Taxa de inóculo (Q)	1557,456	1	1557,456	0,823392	0,394354
(2) Quantidade de PC (L)	29661,85	1	29661,85	15,68154	0,005462
Quantidade de PC (Q)	936,7576	1	936,7576	0,495242	0,504327

<i>Fator</i>	<i>Soma dos quadrados</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Médias quadradas</i>	<i>Razão F</i>	<i>Razão p</i>
(3) pH (L)	11363,33	1	11363,33	6,007536	0,044041
pH (Q)	68,00249	1	68,00249	0,035951	0,854997
1L com 2L	3196,001	1	3196,001	1,689653	0,234811
1L com 3L	154,0013	1	154,0013	0,081417	0,783644
2L com 3L	1487,851	1	1487,851	0,786593	0,404572

$$R^2 = 0,79$$

F = razão entre a variabilidade das amostras e a variabilidade dentro da amostra;

P = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (5%);

R^2 = coeficiente de determinação para o ajuste do modelo à superfície de resposta.

L = interação linear

Q= interação quadrático

Em um planejamento experimental tipo DCCR pode-se gerar uma superfície de resposta, um gráfico tridimensional. Na Figura 13 é mostrada a superfície gerada para as variáveis independentes estudadas de pH e quantidade de PC no extrato e a concentração de GA_3 como variável de resposta.

O ponto ótimo da resposta da superfície deve aparecer no centro da superfície, como o objetivo é o aumento da produção de GA_3 , o ponto ótimo representa o ponto mais alto da superfície. Observando-se a Figura 13, nota-se que o ponto ótimo não foi atingido e que com o aumento do pH e da quantidade de PC no extrato, a superfície atinge o ponto ótimo. Com isso, um novo planejamento experimental foi feito com as variáveis significativas, pH e quantidade de PC no extrato. A taxa de inoculação foi fixada em 10%, quantidade já utilizada em experimentos anteriores.

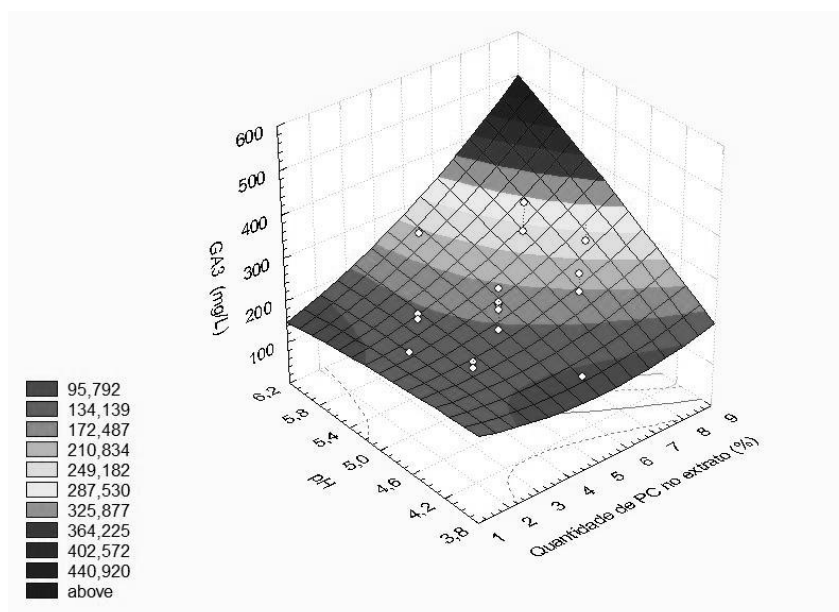


Figura 13. Superfície de resposta gerada após planejamento experimental DCCR 2³ para as variáveis % de PC e pH.

A segunda etapa da otimização das variáveis físicas e químicas foi conduzida com o suporte de um planejamento experimental do tipo DCCR 2² para as variáveis pH e quantidade de PC no extrato aquoso. De acordo com a Tabela 27, a melhor produção de GA₃ foi obtida com pH 6,5 e quantidade de PC no extrato de 14% (m/v), ensaio no ponto central, sendo a média da concentração de GA₃ de 230,7 ± 24,1 mg/L. A menor produção de GA₃ (77,5 mg/L) foi obtida utilizando pH 7,6 e 14% (m/v) de quantidade de PC no extrato, seguida de 91,8 mg/L com pH 5, 4 e 9,74% de quantidade de PC no extrato.

Tabela 27. Resultados do planejamento experimental DCCR 2² para as variáveis pH e quantidade de PC no extrato

<i>Ensaio</i>	<i>pH</i>	<i>Quantidade de PC no extrato (%)</i>	<i>GA₃ (mg/L)</i>
1	5,4	9,74	91,8
2	7,6	9,74	141,7
3	5,4	18,26	149,5
4	7,6	18,26	208,9
5	5,0	14,00	102,5
6	8,0	14,00	77,5
7	6,5	8,00	145,4
8	6,5	20,00	200,3
9	6,5	14,00	227,5
10	6,5	14,00	208,3
11	6,5	14,00	256,2

A ANOVA é mostrada na Tabela 28, o R² obtido foi de 0,79 é considerado aceitável para um planejamento experimental tipo DCCR. A ANOVA mostra que o único fator que é significativo em 95% é o pH com interação quadrática. Os demais fatores não foram significativos na faixa estudada.

Tabela 28. ANOVA dos resultados para o planejamento experimental DCCR 2² para as variáveis pH e quantidade de PC no extrato.

<i>Fator</i>	<i>Soma dos quadrados</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Médias quadradas</i>	<i>Razão F</i>	<i>Razão p</i>
(1) pH (L)	1919,629	1	1919,629	1,095562	0,34318
pH (Q)	22445,7	1	22445,7	12,81011	0,01589
(2) Quantidade PC no extrato (L)	7988,077	1	7988,077	4,558919	0,085841
Quantidade PC no extrato (Q)	2629,347	1	2629,347	1,500609	0,275134
1L com 2L	886,2045	1	886,2045	0,505771	0,508767

$$R^2 = 0,79$$

F = razão entre a variabilidade das amostras e a variabilidade dentro da amostra;

P = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (5%);

R^2 = coeficiente de determinação para o ajuste do modelo à superfície de resposta.

L = interação linear

Q= interação quadrático

O resultado da otimização gerou uma superfície de resposta (Figura 14), na qual é possível observar que o melhor resultado de produção de GA_3 foi obtido na condição central das variáveis. A região que representa maior produção de GA_3 , cinza escuro, inicia em torno de 12% (m/v) de quantidade de PC no extrato e chega até em torno de 20%. A região ótima para o pH inicia em torno do pH 5,5 e termina no pH 6,5. Dentro dessa faixa a concentração de GA_3 tem pouca variação.

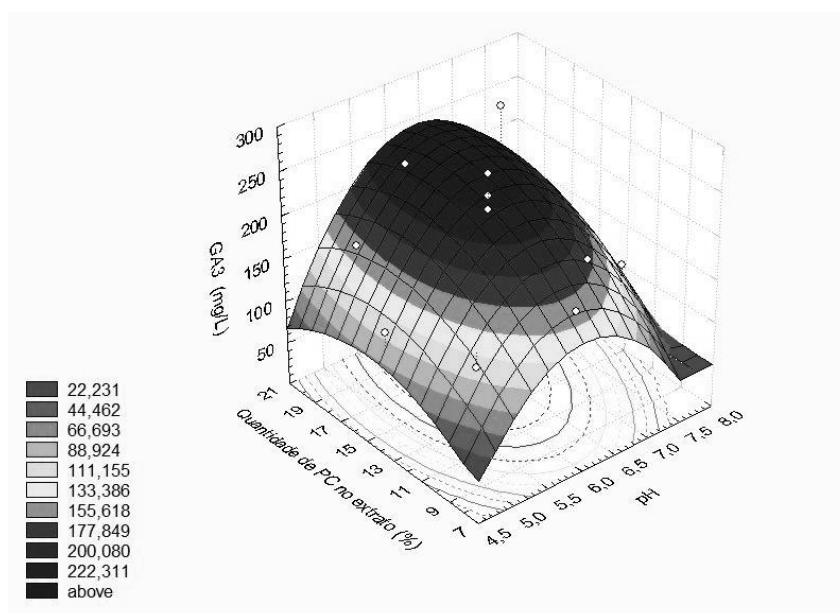


Figura 14. Superfície de resposta gerada no planejamento experimental DCCR 2^2 .

Os parâmetros estabelecidos na otimização das variáveis físicas e químicas foram: taxa de inoculação de 10%, que foi fixada porque a variação da taxa de inoculação estudada não foi significativa para a produção de GA_3 . O pH fixado foi de pH 5,5 (natural da PC) e a quantidade de PC adicionada ao extrato aquoso foi de 12% (base úmida, que corresponde a 10% de PC na base seca). Esses parâmetros correspondem à máxima produção de GA_3 obtida. Nestas condições a produção de GA_3 foi de aproximadamente 220 mg/L (2,6 g de GA_3 /kg de PC seca).

3.1.2. Adição de nutrientes ao EAPC

3.1.2.1. Suplementação de fonte de carbono e fonte de nitrogênio no EAPC (one factor at a time).

A adição de nutrientes ao extrato de PC iniciou com a seleção de uma fonte de carbono e uma fonte de nitrogênio, as quais foram avaliadas separadamente. Os resultados estão apresentados na Tabela 29.

A produção de GA₃ no ensaio controle (sem a suplementação de nutrientes) foi superior a produção de GA₃ com suplementação de fonte de carbono ou nitrogênio. Nesse ensaio, a produção de GA₃ obtida foi de 210 mg/L. A melhor produção alcançada utilizando fonte de carbono foi de 175,2 mg/L com sacarose, e a melhor produção obtida utilizando fonte de nitrogênio foi de 170,3 mg/L com uréia. A menor produção de GA₃ foi obtida com suplementação de amido, 98 mg/L.

Tabela 29. Produção de GA₃ com suplementação de fonte de carbono e fonte de nitrogênio ao EAPC.

Fonte de carbono / Fonte de nitrogênio	GA₃ (mg/L)
Glicose	102,5 ± 14,3
Sacarose	175,2 ± 18,5
Amido	98,0 ± 13,1
NaNO ₃	162,5 ± 9,6
NH ₄ Cl	163,6 ± 14,3
Uréia	170,3 ± 20,7
Controle	210,0 ± 13,6

Rodrigues (2010) observou que a produção de GA₃ com suplementação de amido como fonte de carbono foi de 4,87 g de GA₃/kg de PC seca, com suplementação de uréia foi de 5,37 g de GA₃/kg de PC seca e sem a suplementação de nutrientes, a produção de GA₃ foi de 6,07 g de GA₃/kg de PC seca. A produção de GA₃ foi superior no ensaio sem a suplementação de nutrientes e o mesmo resultado foi observado neste estudo.

Para a etapa de seleção de nutrientes, realizada com o suporte de um planejamento Plackett & Burman, foram selecionados a sacarose como fonte de carbono e a uréia como fonte de nitrogênio. Apesar de apresentarem produções de GA₃ inferior ao ensaio controle, a adição destas fontes apresentou a segunda e a terceira melhor produção de GA₃.

3.1.2.2. Seleção de nutrientes adicionados ao EAPC

A seleção de nutrientes adicionados ao EAPC foi conduzida com o emprego de um planejamento do tipo Plackett & Burman. Os resultados de produção de GA₃ estão apresentados na Tabela 30.

Tabela 30. Resultados do planejamento Plackett & Burman para seleção de nutrientes adicionados ao EAPC.

Ensaio	Sacarose	Uréia	MgSO ₄	KH ₂ PO ₄	(NH ₄)FeSO ₄	MnSO ₄	H ₃ BO ₃	NaMoO ₄	GA ₃ (mg/L)
1	40	0	1	0	0	0	0,001	0,001	147,1
2	40	0,75	0	5	0	0	0	0,001	103,2
3	0	0,75	1	0	0,02	0	0	0	220,9
4	40	0	1	5	0	0,001	0	0	211,1
5	40	0,75	0	5	0,02	0	0,001	0	150,5
6	40	0,75	1	0	0,02	0,001	0	0,001	184,0
7	0	0,75	1	5	0	0,001	0,001	0	76,1
8	0	0	1	5	0,02	0	0,001	0,001	145,3
9	0	0	0	5	0,02	0,001	0	0,001	70,9
10	40	0	0	0	0,02	0,001	0,001	0	80,1
11	0	0,75	0	0	0	0,001	0,001	0,001	100,9
12	0	0	0	0	0	0	0	0	128
13	20	0,375	0,5	2,5	0,01	0,0005	0,0005	0,0005	115,9
14	20	0,375	0,5	2,5	0,01	0,0005	0,0005	0,0005	114,8
15	20	0,375	0,5	2,5	0,01	0,0005	0,0005	0,0005	124,6

De acordo com os resultados, a maior produção foi de 220,9 mg/L obtida com adição de uréia, MgSO₄ e (NH₄)FeSO₄. A segunda maior concentração de GA₃ foi de 211,1 mg/L com a adição de sacarose, MgSO₄, KH₂PO₄ e MnSO₄. Essas produções foram superiores ao ensaio sem a adição de nutrientes que apresentou uma produção de 128 mg/L. A menor produção foi de 70,9 mg/L com a adição de KH₂PO₄, (NH₄)FeSO₄, MnSO₄ e NaMoO₄. Para verificar quais nutrientes influenciam na produção de GA₃, é necessário analisar o Diagrama de Pareto (Figura 15).

De acordo com o diagrama de Pareto, somente o MgSO₄ é significativo para a produção de GA₃ e essa influência é positiva, ou seja, a presença de MgSO₄ aumenta a produção de GA₃. Os outros nutrientes não são significativos na produção mesmo com um nível de significância de 90 % ($p < 0,1$) e $R^2 = 0,71$.

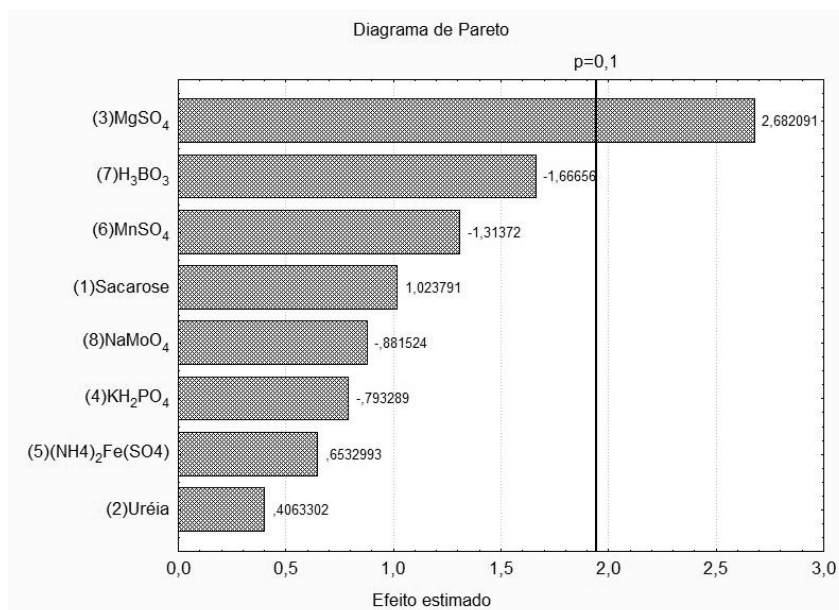


Figura 15. Diagrama de Pareto para o planejamento Plackett & Burman para seleção de sais a serem adicionados ao EAPC.

Neste estudo foi escolhido o MgSO_4 para suplementar o EAPC para produzir GA_3 pois de acordo com o planejamento experimental, somente a adição de MgSO_4 influencia na produção de GA_3 e essa influência é positiva, ou seja, a presença de MgSO_4 no EAPC aumenta a produção de GA_3 .

3.1.2.3. Determinação da melhor concentração de MgSO_4 para produção de GA_3 .

Os resultados da produção de GA_3 com diferentes concentrações estão apresentados na Figura 16.

A maior produção de GA_3 foi obtida com a adição de 0,5 g/L de MgSO_4 (211 mg/L). O ensaio sem a adição de MgSO_4 ao EAPC teve uma produção de 129,8 mg/L. A menor produção foi de 122,3 mg/L obtida ao adicionar 2,0 mg/L de MgSO_4 ao EAPC. Com isso, definiu-se que a produção de GA_3 por fermentação submersa deveria ocorrer com a adição de 0,5 g/L de MgSO_4 ao EAPC preparado na concentração de 10% (m/v).

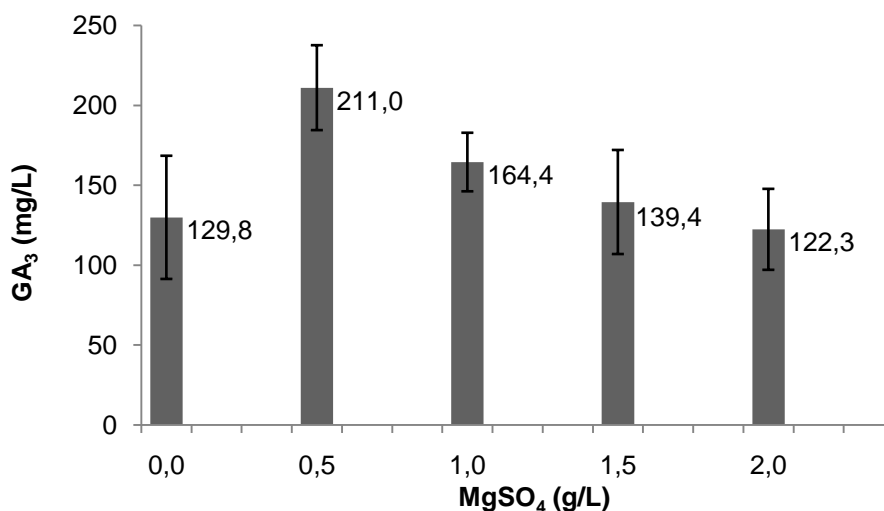


Figura 16. Produção de GA₃ com diferentes concentrações de MgSO₄ adicionados ao EAPC.

Outros trabalhos utilizaram o MgSO₄ na composição do meio de cultivo para a produção de GA₃. Shukla, Chand e Srivastava (2005); Corona, Sanchez e Agostin (2005) e Escamilla *et al.* (2000) utilizaram MgSO₄ como fonte de magnésio nas concentrações entre 0,5 e 2,0 g/L e obtiveram produção de GA₃ de 1 g/L, 4,5-5 g/kg e 2,8 g/L, respectivamente.

3.1.3. Estudo da cinética de produção de GA₃ em EAPC utilizando *Gibberella fujikuroi* LPB-06

Nesta etapa foi realizado um estudo da cinética da produção de GA₃, crescimento de biomassa, pH e consumo de açúcares totais e redutores ao longo de 360 horas de fermentação. Os resultados são mostrados na Figura 17 e Figura 18.

A produção de GA₃ inicia em um período entre 48 e 72 horas. Em 336 horas de fermentação, obteve-se 320 mg/L de GA₃ (3,7 g de GA₃/kg de PC seca), a máxima concentração de GA₃ obtida. De acordo com o gráfico da Figura 17, a produção de GA₃ não aumenta de forma contínua e há oscilação ao longo do tempo. Rodrigues (2010) observou uma oscilação da concentração do GA₃ e atribui que essas variações na concentração de GA₃ podem estar relacionadas à sua degradação do GA₃ e sua transformação em outras moléculas necessárias à sobrevivência do fungo.

A biomassa inicia seu crescimento logo após a inoculação. Em 24 horas de cultivo a concentração aumenta de 0,85 g/L para 2,04 g/L assim, a biomassa não apresenta fase lag de crescimento pois o inóculo cresceu em meio contendo EAPC.

Portanto, o fungo apresenta-se adaptado ao meio EAPC, o que elimina a necessidade e tempo maior para a adaptação. O período de crescimento exponencial da biomassa inicia no tempo zero e termina em 48 horas, após esse período a biomassa continua crescendo em uma taxa menor até o tempo de 144 horas de cultivo, quando inicia a fase estacionária que persiste até o final do cultivo. A concentração máxima de biomassa obtida é 7,67 g/L após 240 horas de cultivo.

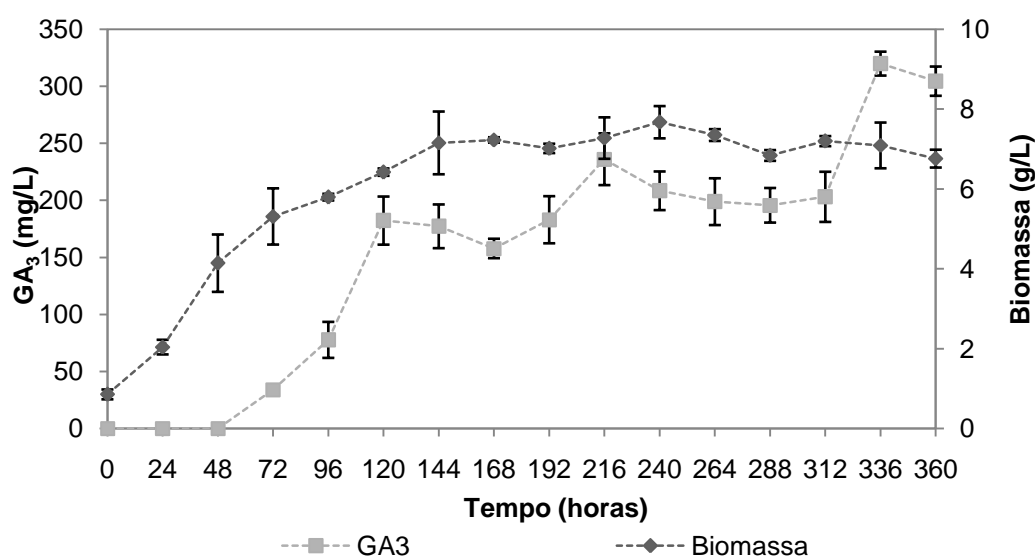


Figura 17. Cinética de produção de GA₃ e crescimento da biomassa em frascos de Erlenmeyer em EAPC otimizado

O consumo de açúcares totais (Figura 18) inicia nas primeiras 24 horas de cultivo, sendo que a concentração varia de 18,4 a 13,6 g/L. Os açúcares totais são consumidos até 144 horas de cultivo, período que corresponde ao crescimento da biomassa e início da fase estacionária. Após 144 horas, a concentração de açúcares se mantém constante em torno de 2 g/L. O perfil de consumo de açúcares redutores acompanha o consumo de açúcares totais. No período de 24 a 72 horas percebe-se um aumento na concentração de açúcares redutores, isso pode representar a hidrólise de açúcares totais em açúcares redutores pelo fungo. De 72 a 144 horas há a queda na concentração de açúcares e, após esse período, a concentração de açúcares se manteve constante em torno de 1,5 g/L.

Os valores de pH aumentaram ao longo da fermentação. O pH inicial era de 4,75 e quando iniciou a produção de GA₃, o valor do pH está acima de 6,0. A partir desse período o pH aumentou até 8,77, ao final de 360 horas de fermentação. O

aumento do pH ao longo da fermentação pode ser indício de produção de amônia quando a fonte de carbono começa a ficar limitada (Borrow *et al.*, 1964).

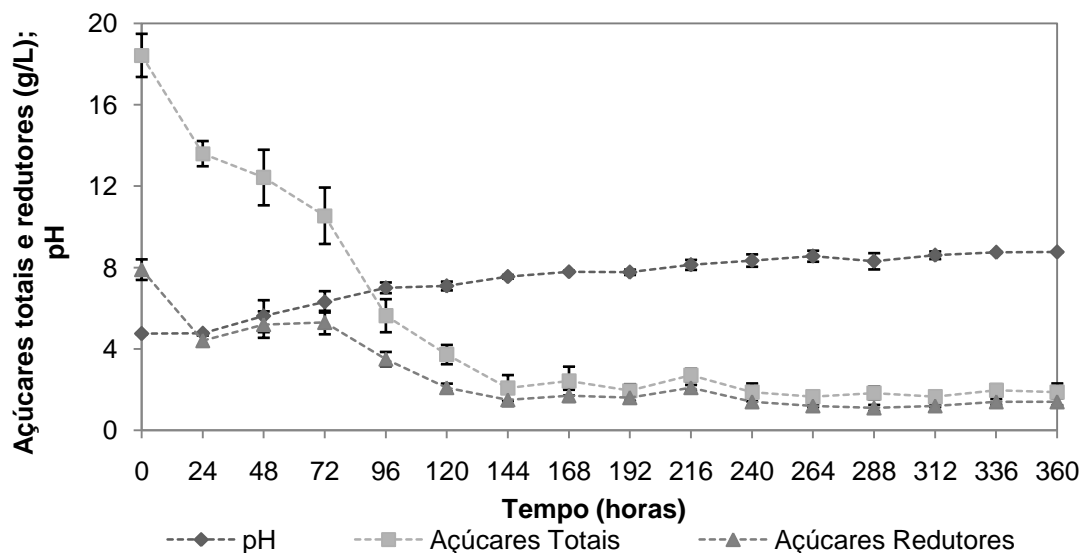


Figura 18. Cinética de aumento do pH e consumo de açúcares em frascos de Erlenmeyer em EAPC otimizado

3.1.4. Produção de GA_3 ao longo do processo de otimização

A otimização da produção de GA_3 em EAPC envolveu várias etapas. As etapas de otimização com seus respectivos ganhos no processo estão apresentadas resumidamente na Tabela 31. Observa-se um ganho significativo na produção de GA_3 em cada etapa em relação à condição inicial de fermentação em EAPC e com a cinética de produção obteve uma produção de 320 mg/L em 336 horas. Durán-Páramo, *et al.* (2004) utilizando células livres de *G. fujikuroi* obtiveram uma produção de 206 mg/L (produtividade de 0,6 mg/L.h) em 336 horas de fermentação. Utilizando células imobilizadas, obteve uma produção de 160 mg/L (produtividade de 0,6 mg/L.h) em 264 horas de fermentação.

Tabela 31. Resumo das etapas de otimização da produção de GA_3 em EAPC.

<i>Etapas</i>	<i>Máxima produção de GA_3</i>	<i>Ganhos no processo</i>
Condição inicial	150 mg/L em 120 horas	-
1 – Primeira otimização físico-química	230,2 mg/L em 120 horas	Aumento de 53 % na produção em relação a condição inicial
2 – Segunda otimização físico-química	230,7 mg/L em 120 horas	Aumento de 53 % na produção em relação a condição inicial

3 - Adição de nutrientes ao EAPC	211,0 mg/L em 120 horas	Aumento de 41 % na produção em relação a condição inicial
4 – Cinética em frascos de Erlenmeyer	320,0 mg/L em 336 horas	Aumento de 113 % na produção em relação a condição inicial e aumento de 52 % em relação a condição 3.

3.2. Otimização das variáveis físicas e químicas em fermentação no estado semissólido utilizando polpa cítrica (PC)

3.2.1. Planejamento experimental para otimização do tamanho da partícula e quantidade de PC na suspensão de PC (SPC)

Nesta etapa foi realizado um planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR) (Tabela 32). O melhor resultado de produção de GA₃ foi obtido com a condição do ponto central do experimento (granulometria 2-2,8 mm e quantidade de PC de 6%), com uma produção de em média de 178,2 mg/L (média de 197,9; 167,9 e 169,0). Com a granulometria maior que 4 mm, houve uma produção de 125,2 mg/L de GA₃. A menor produção de GA₃ (58,8 mg/L) foi obtida com granulometria de 0,8-2,0 mm e concentração de PC de 8%. O menor tamanho das partículas permite uma maior superfície de contato entre o fungo e o substrato, mas há uma maior compactação do meio. Partículas de tamanho maior diminuem a superfície de contato do fungo com o substrato, porém, não permitem a compactação do meio. Partículas maiores de PC favorecem a produção de GA₃ utilizando a FESS.

Tabela 32. Condições experimentais do planejamento DCCR para FESS

Ensaio	Tamanho da partícula (mm)	Quantidade de PC (%)	GA₃ (mg/L)
1	0,85-2	4	128,6
2	0,85-2	8	58,8
3	2,8-4	4	157,5
4	2,8-4	8	107,3
5	Menor que 0,85	6	116,5
6	Maior que 4	6	125,2
7	2-2,8	3,18	141,9
8	2-2,8	8,82	120,0
9	2-2,8	6	197,9
10	2-2,8	6	167,9
11	2-2,8	6	169,0

A análise das interações entre as variáveis pode ser visualizada na Tabela 33. Com o $R^2=0,83$, a tabela da ANOVA mostra que somente a interação quadrática da granulometria e a interação quadrática da concentração de PC apresentaram significância ($p<0,05$) na faixa estudada. A interação entre granulometria e concentração de PC não apresentou significância. Este resultado foi confirmado pela superfície de resposta gerada (Figura 19), em que a região em cinza escuro representa a maior produção de GA_3 . Esta região é limitada pela granulometria entre 0,85 e 2 e, entre 2,8 e 4 mm e pela quantidade de PC na SPC de 4 a 8%. Granulometria inferior a 0,85 e 2 mm e superior a 2,8 e 4 mm e quantidade de PC inferior a 4 % e superior a 8 % não representam a região ótima de produção de GA_3 .

Tabela 33. ANOVA para o planejamento experimental DCCR (granulometria e concentração de PC) em FESS

<i>Fator</i>	<i>Soma dos quadrados</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Médias quadradas</i>	<i>Razão F</i>	<i>Razão p</i>
(1) Granulometria (L)	1002,31	1	1002,31	2,065215	0,210196
Granulometria (Q)	5750,471	1	5750,471	11,8486	0,018392
(2) Concentração de PC (L)	2850,264	1	2850,264	5,872846	0,059866
Concentração de PC (Q)	4075,017	1	4075,017	8,396396	0,033883
1L por 2L	96,19054	1	96,19054	0,198196	0,674793

$$R^2 = 0,83$$

F = razão entre a variabilidade das amostras e a variabilidade dentro da amostra; P = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (5%); R^2 = coeficiente de determinação para o ajuste do modelo à superfície de resposta; L = interação linear; Q = interação quadrática

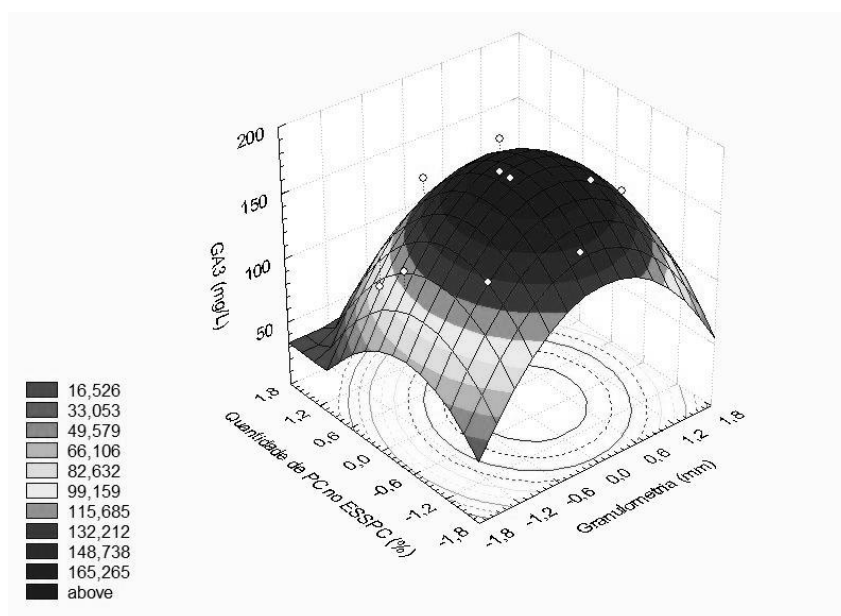


Figura 19. Superfície de resposta para o planejamento experimental DCCR (granulometria e quantidade de PC na SPC).

LEGENDA: Eixo granulometria (-141 significa menor que 0,85 mm, -1 significa 0,85 a 2 mm, 0 significa 2 a 2,8 mm, +1 significa 2,8 a 4 mm e +1,41 significa maior que 4 mm)

Eixo concentração (-1,41 significa 3,18 %, -1 significa 4 %, 0 significa 6 %, +1 significa 8 % e +1,41 significa 8,82 %)

Machado (2002) utilizou como substrato casca de café e bagaço de mandioca em FES para produção de GA_3 com granulometria entre 0,8 e 2,0 mm. A utilização de partículas menores favoreceu a produção de GA_3 em FES enquanto que em FESS, essa faixa de tamanho de partícula desfavorece a produção de GA_3 necessitando partículas de tamanho maior.

Portanto, neste estudo pode-se definir que, no processo de produção de GA_3 por FESS, a melhor granulometria da PC a ser utilizada é de entre 2 e 2,8 mm e quantidade de PC na SPC é 5%.

3.2.2. Adição de nutrientes a SPC na FESS

3.2.2.1. Seleção de nutrientes a serem adicionados a SPC

A seleção de nutrientes para serem adicionados a SPC foi conduzida com o teste da influência dos componentes do meio de cultivo ICI (Candau, Avalos e Cerda-Olmedo, 1992), sacarose e uréia

A seleção de nutrientes a serem adicionados ao meio foi com o suporte de um planejamento do tipo Plackett & Burman. Os resultados de produção de GA_3 estão apresentados na Tabela 34. A maior produção de GA_3 foi de 208,8 mg/L, a qual corresponde ao ensaio contendo sacarose, uréia, $MgSO_4$, $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$, $MnSO_4$ e $NaMoO_4$. Obteve-se 205,9 mg/L no ensaio contendo sacarose, ureia, KH_2PO_4 e $NaMoO_4$. As menores produções de GA_3 foram 50,2 e 55,4 mg/L, no ensaio contendo sacarose, $(NH_4)FeSO_4$, $MnSO_4$ e H_3BO_3 e no ensaio contendo KH_2PO_4 , $(NH_4)FeSO_4$, $MnSO_4$ e $NaMoO_4$, respectivamente.

Tabela 34. Resultados de produção de GA_3 no planejamento Plackett & Burman para seleção de nutrientes em FESS

Ensaio	Sacarose (g/L)	Uréia (g/L)	$MgSO_4$ (g/L)	KH_2PO_4 (g/L)	$(NH_4)FeSO_4$ (g/L)	$MnSO_4$ (g/L)	H_3BO_3 (g/L)	$NaMoO_4$ (g/L)	GA_3 (mg/L)
1	20	0	1	0	0	0	0,001	0,001	81,9

2	20	0,75	0	5	0	0	0	0,001	205,9
3	0	0,75	1	0	0,02	0	0	0	166,1
4	20	0	1	5	0	0,001	0	0	120,0
5	20	0,75	0	5	0,02	0	0,001	0	154,0
6	20	0,75	1	0	0,02	0,001	0	0,001	208,8
7	0	0,75	1	5	0	0,001	0,001	0	88,8
8	0	0	1	5	0,02	0	0,001	0,001	103,3
9	0	0	0	5	0,02	0,001	0	0,001	55,4
10	20	0	0	0	0,02	0,001	0,001	0	50,2
11	0	0,75	0	0	0	0,001	0,001	0,001	115,9
12	0	0	0	0	0	0	0	0	171,3
13	10	0,375	0,5	2,5	0,01	0,0005	0,0005	0,0005	180,6
14	10	0,375	0,5	2,5	0,01	0,0005	0,0005	0,0005	167,9
15	10	0,375	0,5	2,5	0,01	0,0005	0,0005	0,0005	159,8

De acordo com Diagrama de Pareto (Figura 20), os nutrientes que influenciam significativamente a produção de GA_3 , com $p < 0,1$ e $R^2 = 0,72$, são a ureia e o H_3BO_3 . O Diagrama de Pareto mostra que a ureia tem uma influência positiva na produção de GA_3 , ou seja, a presença da ureia aumenta a produção de GA_3 . O Diagrama mostra que o H_3BO_3 tem uma influência negativa a produção de GA_3 , ou seja, a presença do H_3BO_3 no meio de cultivo diminui a produção de GA_3 .

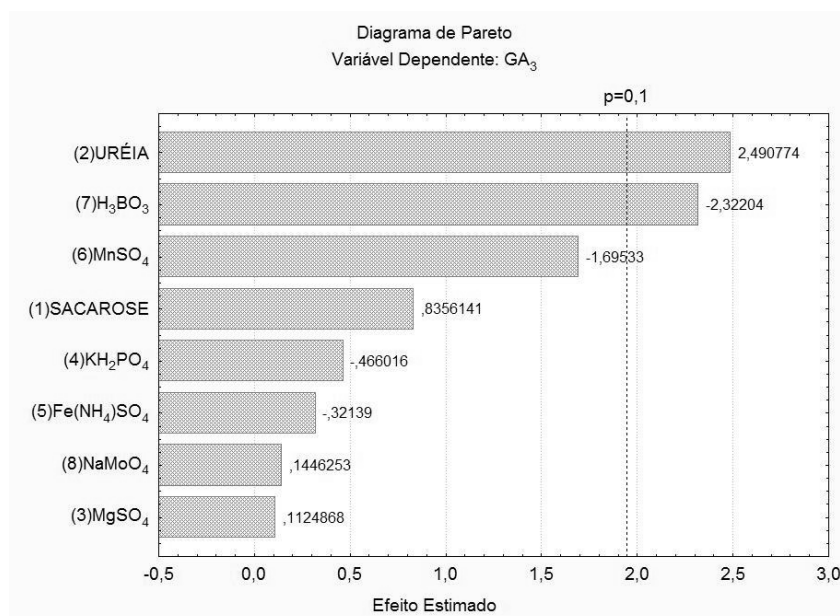


Figura 20. Diagrama de Pareto – Plackett & burman para seleção de nutrientes em FESS

Ao realizar a análise da produção de GA_3 em cada ensaio separadamente, verifica-se que as maiores concentrações do GA_3 foram obtidas em meio contendo sacarose e NaMoO_4 . De acordo com o diagrama de Pareto, a sacarose e o NaMoO_4

estão abaixo da linha de significância, mas a sacarose está mais próxima da linha de significância que o NaMoO_4 , ou seja, tem uma influência maior na produção que o NaMoO_4 .

Portanto, para otimização de nutrientes adicionados a SPC, foram escolhidos a uréia e a sacarose. A adição de ambos componentes na otimização promoverá diferenças na proporção entre carbono e nitrogênio (C/N) do meio, e estas diferenças na proporção podem influenciar na produção de GA_3 (Rodrigues *et al.*, 2011).

3.2.2.2. Otimização da concentração de sacarose e ureia para produção de GA_3 .

Neste estudo foi realizado um planejamento experimental do tipo DCCR para otimização da concentração de sacarose e ureia a serem adicionadas a SPC. Os resultados de produção de GA_3 estão apresentados na Tabela 35. A maior produção de GA_3 (284,4 mg/L) foi obtida na condição de 20 g/L de sacarose e 0,6 g/L de ureia, ou seja, condição do ponto central para sacarose e condição no ponto axial (-1,41) para uréia. Nesta condição, verifica-se que uma relação C/N alta favorece o acúmulo de GA_3 .

A menor produção de GA_3 (83,1 mg/L) foi obtida com 5,9 g/L de sacarose e 1,13 g/L de ureia. Nesta condição a relação carbono/nitrogênio é baixa, o que de acordo com Rodrigues *et al.* (2011) não favorece a produção de GA_3 .

Tabela 35. Planejamento experimental DCCR 2² – Influência das variáveis sacarose e ureia sobre a produção de GA_3 por FESS.

<i>Ensaio</i>	<i>Sacarose (g/L)</i>	<i>Uréia (g/L)</i>	<i>GA₃ (mg/L)</i>
1	10	0,75	192,7
2	10	1,5	126,3
3	30	0,75	264,8
4	30	1,5	265,4
5	5,9	1,13	83,1
6	34,1	1,13	156,9
7	20	0,6	284,4
8	20	1,65	102,1
9	20	1,13	219,8
10	20	1,13	219,8
11	20	1,13	251,5

Ao realizar a análise das interações entre as variáveis sacarose e uréia pela ANOVA (

Tabela 36) verifica-se que, na faixa de concentração estudada, nenhuma variável é significativa ($p < 0,05$) com o ajuste do modelo (R^2) igual a 0,74.

Tabela 36. ANOVA para a otimização da concentração de sacarose e uréia em FESS.

<i>Fator</i>	<i>Soma dos quadrados</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Médias quadradas</i>	<i>Razão F</i>	<i>Razão p</i>
(1) Sacarose (L)	12390,08	1	12390,077	4,76174	0,08089
Sacarose (Q)	9555,953	1	9555,9526	3,67253	0,11345
(2) Uréia (L)	13070,69	1	13070,692	5,02331	0,07509
Uréia (Q)	113,638	1	113,63797	0,04367	0,84271
1L com 2L	1098,56	1	1098,5597	0,4222	0,54451

$$R^2 = 0,74$$

F = razão entre a variabilidade das amostras e a variabilidade dentro da amostra; p = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (5%); R^2 = coeficiente de determinação para o ajuste do modelo à superfície de resposta; L = interação linear; Q = interação quadrática.

Na superfície de resposta gerada com os resultados (Figura 21), a região ótima de produção de GA_3 (região em cinza escuro) encontra-se na faixa de concentração de sacarose de 10 a 28 g/L. Para a ureia a região ótima de produção do ácido está em torno de 0,9 g/L.

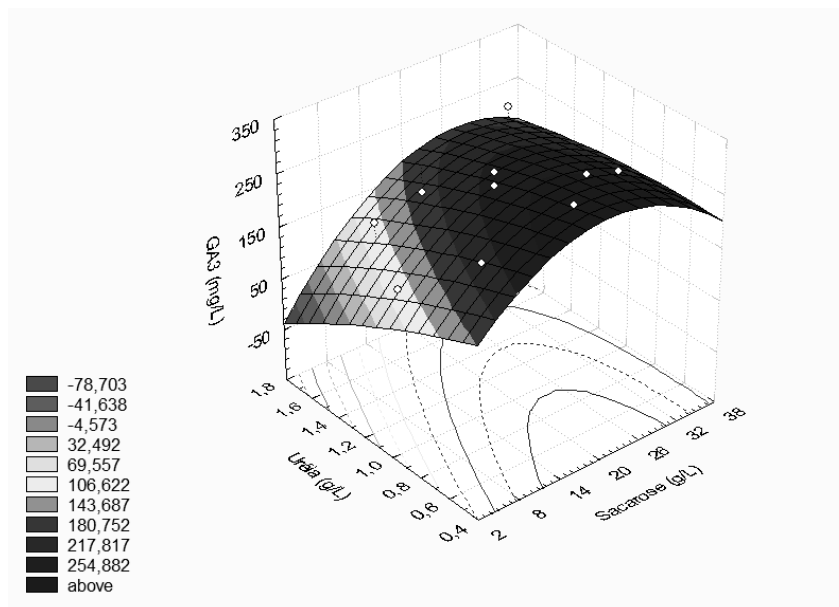


Figura 21. Superfície de resposta para o planejamento DCCR 2^2 para otimização da concentração de sacarose e ureia em FESS

Apesar da região ótima da superfície não estar fechada quanto ao eixo da concentração de uréia, a otimização foi considerada válida pelo ajuste do modelo R^2

= 0,74, além de estudos anteriores que mostraram que a presença da ureia no meio tem influência na produção de GA₃ (Rodrigues, 2010)

Deste modo, de acordo com os resultados do planejamento de otimização da concentração de sacarose e uréia, foi definido que para uma maior produção de GA₃, deve-se adicionar 20 g/L de sacarose e 0,6 g/L de uréia a SPC.

3.2.3. Cinética de produção de GA₃ por FESS

Nesta etapa realizou-se o estudo da cinética da produção de GA₃, crescimento de biomassa, pH e consumo de açúcares totais e redutores ao longo de 360 horas de FESS. Os resultados são apresentados na Figura 22 e Figura 23.

Os valores de pH aumentaram ao longo da fermentação de 5,00 a 7,6 em 360 horas de fermentação. Esse aumento do pH ao longo da fermentação foi observado na fermentação submersa utilizando como substrato o EAPC.

A produção de GA₃ iniciou em um período entre 72 e 96 horas. Como observado em EAPC, após 120 horas de fermentação, a concentração de GA₃ não aumentou de forma contínua (Figura 22) e houve oscilação ao longo do tempo. A maior concentração de GA₃ obtida foi 331 mg/L em 240 horas de cultivo, com uma produtividade de 1,38 mg/L/h.

A biomassa apresentou crescimento nas primeiras 24 horas de cultivo, pois teve um aumento de 0,44 g/L a 2,13 g/L. Portanto, não foi observado fase de adaptação. Esse comportamento da biomassa foi observado em EAPC por fermentação submersa (seção 3.1.3). A fase exponencial de crescimento corresponde ao período de 0 a 48 horas de cultivo. Após 48 horas a biomassa iniciou a fase estacionária, na qual permaneceu até o fim do cultivo. A concentração máxima de biomassa obtida é 4,44 g/L após 264 horas de cultivo. A produção de GA₃ iniciou após 72 horas de fermentação, período em que a biomassa estava na fase estacionária de crescimento. O início da produção dá-se na fase estacionária de crescimento por se tratar de um metabólito secundário.

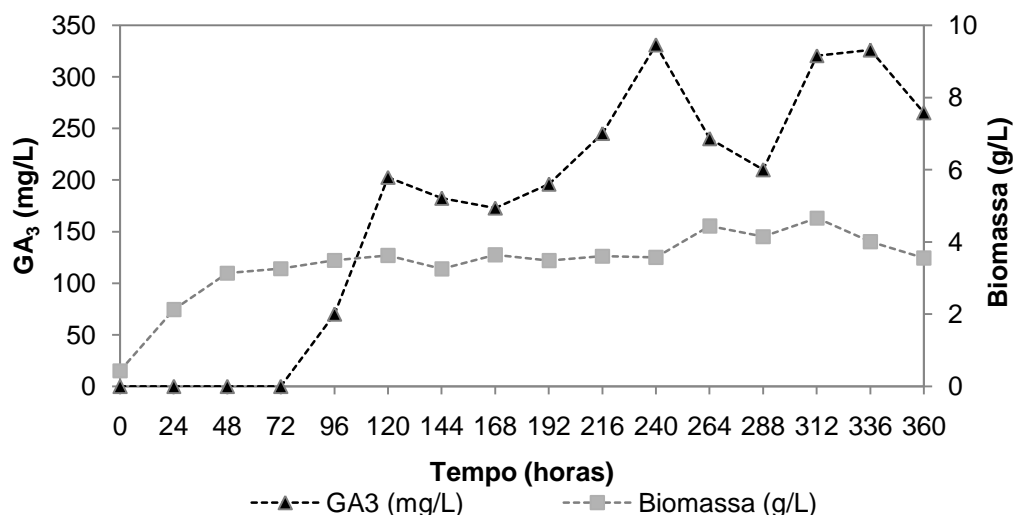


Figura 22. Estudo da cinética de crescimento da biomassa e produção de GA₃ por FESS

A concentração de açúcares totais nas primeiras 48 horas diminuiu de 20,8 g/L para 15,9 g/L. A maior taxa de consumo de açúcares totais ocorreu entre 48 e 72 horas, pois a concentração variou de 15,9 g/L a 7,1 g/L. Após esse período, o consumo ocorreu com uma taxa menor e no fim da fermentação, a concentração de açúcares totais foi de 2,3 g/L. O perfil de consumo de açúcares redutores foi parecido com o consumo de açúcares totais. No período de 0 a 48 horas percebeu-se um aumento na concentração de açúcares redutores, isso pode representar a hidrólise de açúcares totais em redutores pelo fungo. De 72 a 144 horas houve a queda na concentração de açúcares e, após esse período a concentração de açúcares foi mantida constante em torno de 0,6 g/L.

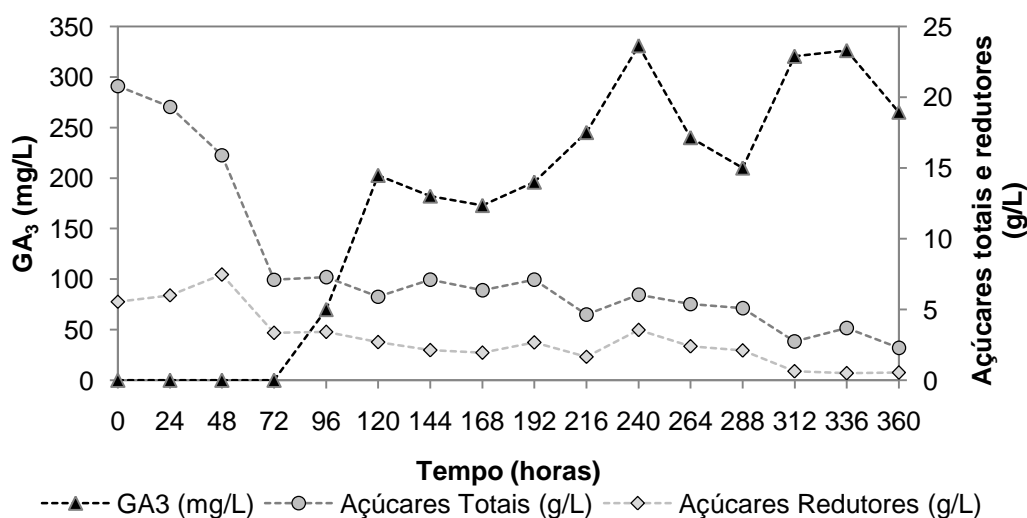


Figura 23. Estudo da cinética de produção de GA₃ e consumo de açúcares totais e redutores por FESS utilizando SPC

3.2.4. Produção de GA₃ ao longo do processo de otimização em SPC

A etapa de otimização da produção de GA₃ em SPC envolveu várias etapas. As etapas de otimização com seus respectivos ganhos no processo estão apresentadas resumidamente na Tabela 37. Observa-se um ganho significativo na produção de GA₃ em cada etapa de otimização em relação a condição inicial de fermentação em SPC. Na etapa de cinética de produção de GA₃, obteve-se 331 mg/L (7,7 g de GA₃/kg de PC seca) em 240 horas de fermentação, o que representa um ganho de 85 % na produção de GA₃ em relação a condição inicial de fermentação.

Tabela 37. Resumo das etapas de otimização da produção de GA₃ em FESS.

<i>Etapas</i>	<i>Máxima produção de GA₃</i>	<i>Produtividade de GA₃ (mg/L.h)</i>	<i>Ganhos no processo</i>
1 – Otimização do tamanho da partícula e quantidade de PC	178,2 mg/L em 120 horas	1,5	-
2 – Seleção de nutrientes	208,8 mg/L em 120 horas	1,7	Aumento de 17% na produção em relação a condição inicial
3 – Otimização de sacarose e uréia	284,4 mg/L em 120 horas	2,4	Aumento de 60% na produção em relação a condição inicial
4 – Cinética em frascos de Erlenmeyer	331 mg/L em 240 horas	1,4	Aumento de 85 % na produção em relação a condição inicial e aumento de 16 % em relação a condição 3.

4. CONCLUSÃO

Com aplicação da estratégia de planejamentos experimentais, houve aumento significativo da produção de GA₃ tanto em fermentação submersa com EAPC, quanto por fermentação semissólida com a SPC.

Em fermentação submersa utilizando o EAPC, a maior concentração de GA₃ obtida foi 320 mg/L (3,7 g de GA₃/kg de PC seca) (produtividade de 0,9 mg/L.h) em 336 horas de fermentação, nas condições: EAPC 10% (10% m/v de PC seca no extrato), pH 5,5 (natural da PC), 10% de taxa de inóculo e 0,5 g/L de MgSO₄, a 29°C

e 120 rpm. Houve um ganho de 113% na produção de GA₃ em relação condição inicial de fermentação em EAPC.

Em fermentação no estado semissólido utilizando a SPC, obteve-se uma concentração de GA₃ de 331 mg/L (7,7 g de GA₃/kg de PC seca) (produtividade de 1,4 mg/L.h) utilizando 5% de PC na SPC, granulometria da PC de 2 a 2,8 mm, 20 g/L de sacarose, 0,6 g/L de uréia, 29°C e 120 rpm. Houve um ganho de 85% na produção de GA₃ em relação à condição inicial de fermentação em SPC.

Comparando os dois sistemas de fermentação, há pouca diferença entre a concentração de GA₃ obtida em relação ao volume do fermentado (320 mg/L em EAPC e 331 mg/L em SPC). Ao comparar a produção por massa seca de PC adicionada no extrato, em SPC obteve-se o dobro de produção de GA₃ em relação ao EAPC (7,7 g de GA₃/kg de PC seca em SPC e 3,7 g de GA₃/kg de PC seca em EAPC). A produtividade de GA₃ em FESS é maior que em FSm, 1,4 e 0,9 mg/L.h, respectivamente.

Na técnica de fermentação submersa, há necessidade de um pré-tratamento da PC para obtenção do extrato aquoso, já para a técnica de fermentação no estado semissólido, a PC não necessita de pré-tratamento. Desta forma, a técnica de FESS torna-se mais vantajosa em relação a FSm.

CAPÍTULO 3

PRODUÇÃO DE GA_3 POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA E FERMENTAÇÃO NO ESTADO SEMISSÓLIDO EM DIFERENTES BIORREATORES: AGITADO E COLUNA DE BOLHAS

RESUMO

A produção de biomoléculas em biorreatores tem como objetivo reproduzir em escala maior o comportamento de uma fermentação em pequena escala (frascos de Erlenmeyer). Aliados à análise da variação de escala, outros efeitos podem ser estudados tais como a agitação e a aeração forçada sobre o processo de interesse. Neste capítulo será apresentado o estudo do aumento de escala para produzir GA_3 em diferentes modelos de biorreatores: do tipo tanque agitado - STR de 10 L (agitação por pás em sistema mecânico) e do tipo coluna de bolhas - BCB de 1,5 L (agitação por bolhas em sistema pneumático). Para o biorreator do tipo STR foram utilizadas combinações de duas taxas de aeração diferentes (1 e 5 L/min) e duas velocidades de agitação (300 e 500 rpm), resultando em quatro fermentações. Para a fermentação em BCB foram utilizadas três taxas de aeração diferentes (0,1, 0,5 e 1 L de ar/min). A fermentação no estado semissólido foi realizada em biorreatores tipo BCB e, foram utilizadas três condições de aeração durante a fermentação (0,1, 0,5 e 1 L de ar/min). A melhor produção de GA_3 obtida por fermentação submersa em STR utilizando EAPC nas condições otimizadas anteriormente foi de 273 mg/L (produtividade de 2,8 mg/L/h) em 96 horas de fermentação na condição de 500 rpm e 1 L de ar/min. A melhor produção obtida por fermentação submersa em BCB foi de 203,1 mg/L (produtividade de 0,9 mg/L/h) em 216 horas de fermentação na condição de 1 L de ar/min. Para a fermentação semissólida utilizando a SPC em BCB, a melhor produção de GA_3 foi de 207,7 mg/L (produtividade de 0,9 mg/L/h) em 216 horas de fermentação obtida na condição de 1 L de ar/min.

Palavras chave: Biorreator tanque agitado, biorreator coluna de bolhas, escalonamento

1. INTRODUÇÃO

O objetivo do aumento de escala de biorreatores é reproduzir em larga escala o comportamento de uma fermentação otimizada em menor escala. Os métodos tradicionais de escalonamento são baseados em modelos teóricos e princípios de similaridades. O problema encontrado no escalonamento é que a completa similaridade nem sempre é possível (Diaz e Acevedo, 1999).

Biorreatores (reatores bioquímicos ou reatores biológicos) são reatores químicos no qual ocorre uma série de reações químicas catalisadas por biocatalisadores. Estes biocatalisadores podem ser enzimas ou células vivas (microbianas, animais e vegetais). Os biorreatores podem ser classificados em dois grandes grupos: biorreatores enzimáticos, nos quais as reações ocorrem na ausência de células vivas e, biorreatores em que as reações ocorrem na presença de células vivas (Schmidell *et al.*, 2001).

O tanque cilíndrico é o reator mais utilizado em bioprocessos. Existe uma grande quantidade de tipos (configurações) de biorreatores e, dentre os tipos de biorreatores existentes, há os biorreatores do tipo tanque agitado e os biorreatores do tipo coluna de bolhas (Doran, 1995).

Biorreatores do tipo tanque agitado (*Stirred tank reactor* – STR) são reatores agitados mecanicamente através de pás internas (impelidores). O sistema de aeração é feito através de um compressor de ar e a sua entrada de ar no biorreator é feita pela parte inferior sendo que a distribuição ocorre através de difusores. A troca de calor é feita através de serpentina interna ou de camisa externa (Doran, 1995).

Os biorreatores do tipo coluna de bolhas (BCB) são reatores agitados pneumaticamente, ou seja, o sistema não possui impelidores e a agitação é realizada através da injeção de ar. Os BCBs são utilizados industrialmente para produção de leveduras de panificação, cerveja e vinagre, para tratamento de águas residuais, entre outros (Doran, 1995; Kantarcia, Borak, e Ulgen, 2005).

O BCB apresenta algumas vantagens sobre o STR, tais como: excelente transferência de calor e de massa. Baixo custo de operação e de conservação devido à ausência de partes móveis internas e ser compacto. A durabilidade do material é maior (Kantarcia, Borak, e Ulgen, 2005).

O objetivo deste capítulo é testar e comparar a produção de GA₃ em diferentes modelos de biorreatores (do tipo tanque agitado e coluna de bolhas) produzindo um pequeno aumento de escala realizado utilizando as técnicas de FSm e FESS.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismos

O microrganismo utilizado no presente trabalho foi a *Gibberella fujikuroi* LPB-06, obtida do banco de cepas do Laboratório de Processos Biotecnológicos I (LPB-I), da Divisão de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, da Universidade Federal do Paraná.

A cepa foi mantida em meio PDA (*Potato Dextrose Agar*) a 4°C e foi repicada para um novo meio de cultivo a cada 3 meses.

2.2. Substratos

A polpa cítrica (PC), um subproduto da agroindústria brasileira, foi empregada como substrato para produção de GA₃. A PC foi fornecida pela empresa Coalma Comércio de Produtos para Alimentação Animal, na forma de *pellets*, os quais foram triturados e classificados de modo a se obter uma granulometria menor que 5 mm.

A PC foi mantida na forma sólida a temperatura ambiente e o EAPC foi preparado no momento do uso. O EAPC foi obtido utilizando 5 g de PC moída (granulometria menor que 5 mm) em 50 mL de água. Essa suspensão é levada a ebulição por 30 minutos em banho-maria e então filtrada para remoção dos sólidos suspensos (Rodrigues, 2010).

Com a PC foi obtida uma suspensão PC (SPC), a qual foi utilizada na fermentação no estado semissólido (FESS). A SPC foi obtido misturando 5 g das partículas de PC com granulometria entre 2 e 2,8 mm com 100 ml de solução de 20 g/L de sacarose e 0,6 g/L de uréia. A SPC foi então esterilizado em autoclave.

2.3. Produção do Inóculo de *G. fujikuroi* LPB-06

A cepa de *G. fujikuroi* LPB-06 foi cultivada em tubo de ensaio contendo meio PDA inclinado e incubada a 30 °C por 168 horas. O micélio foi raspado do meio de cultivo com auxílio de uma alça de níquel e então inoculado nos frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio a base de EAPC a 5% (m/v). O cultivo foi conduzido a 29 °C sob agitação de 120 rpm por 96 horas.

2.4. Aumento de escala da produção de GA₃ por fermentação submersa para biorreator tipo tanque agitado

A produção de GA₃ por fermentação submersa, em biorreator do tipo tanque agitado (*Stirred Tank Reactor* - STR) de 10 litros, iniciou-se com a transferência das condições otimizadas em frascos de Erlenmeyer de 250 mL para o biorreator. O

biorreator modelo Bioflo da marca New Brunswick consiste em um cilindro vertical de vidro borosilicato e tampa de aço inoxidável (Figura 24). A agitação é realizada através de pás internas (impelidores) do tipo hélice. A aeração ocorre através de um compressor de ar cuja entrada de ar no biorreator localiza-se na parte inferior. A temperatura é controlada através de uma camisa externa por onde circula água de resfriamento.



Figura 24. Biorreator tipo STR.

FONTE: A Autora.

Diferentes condições de fermentação foram estudadas no biorreator. Foram utilizadas duas taxas de aeração diferentes (1 e 5 L/min) e duas velocidades de agitação (300 e 500 rpm), resultando em quatro ensaios de fermentação. A combinação entre a agitação e a aeração é mostrada na Tabela 38.

Tabela 38. Combinações entre agitação e aeração para produção de GA₃ em STR.

<i>Experimento</i>	<i>Agitação (rpm)</i>	<i>Aeração (L/min)</i>
1	300	1
2	300	5
3	500	1
4	500	5

Nas quatro condições de fermentação foram utilizados 6 L de meio de cultivo (EAPC 10% m/v com 0,5 g/L de MgSO₄) com taxa de inóculo de 10% v/v, em modo

de batelada, a 29 °C e pH inicial 5,0. Amostras foram retiradas a cada 24 horas para análise de biomassa total, pH, oxigênio dissolvido (dO_2) e concentração de GA_3 .

2.5. Produção de GA_3 por fermentação submersa e fermentação no estado semissólido em biorreator tipo coluna de bolhas

Outro escalonamento foi realizado em biorreator do tipo coluna de bolhas (BCB). Esse sistema não possui pás agitadoras e a agitação é dita pneumática, quando a aeração forçada promove a agitação do meio de cultivo.

O BCB utilizado (Figura 25) foi projetado pelo grupo do projeto do GA_3 e fabricado por um especialista em hialotécnica da empresa Vetrolab. O BCB consiste de um tubo cilíndrico de vidro borossilicato de volume total de 1,5 L e volume útil de 1 L (diâmetro de 80 mm e altura de 300 mm). Possui uma entrada de ar estéril na parte inferior da coluna e as bolhas são formadas através de uma placa porosa. A parte superior (tampa) possui três conexões: uma lateral para saída de ar, uma lateral para entrada de inóculo ou meio de cultivo e a conexão central para coleta de amostra durante a fermentação.

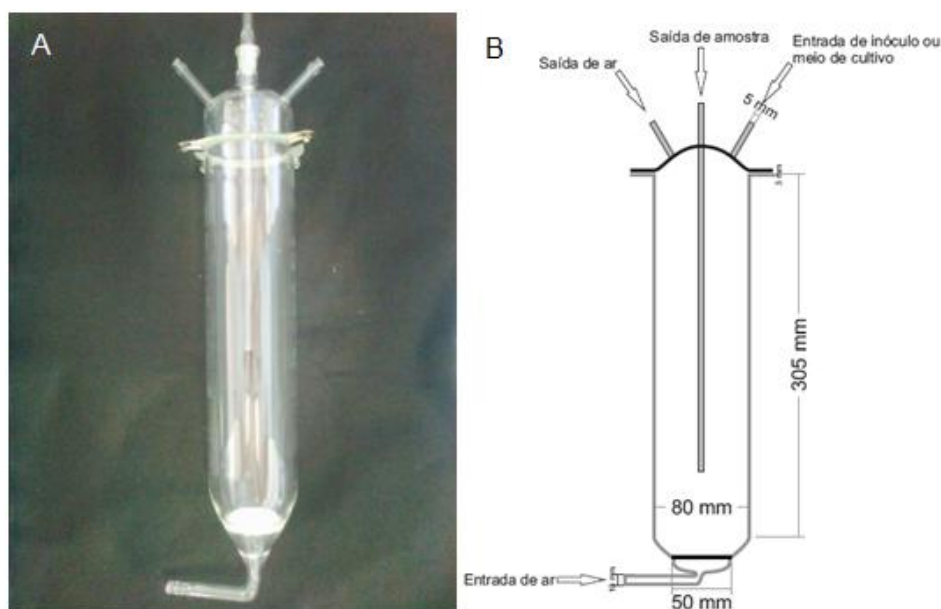


Figura 25. A) Biorreator tipo coluna de bolhas projetado na DEBB. B) Projeto do BCB de 1,5 L com respectivas medidas.

FONTE: A Autora.

Nesse tipo de biorreator a única variável estudada foi a taxa de aeração. Foram empregadas três taxas de aeração constantes (0,1 L/min, 0,5 L/min e 1

L/min). A produção de GA₃ foi realizada neste modelo de biorreator utilizando duas técnicas de fermentação: a FSm e a FESS.

Na FSm as condições utilizadas foram: 1 L de meio de cultivo (EAPC 10% m/v com 0,5 g/L MgSO₄), taxa de inóculo de 10% v/v, a 29°C e pH inicial 5,0. Amostras foram retiradas após 96, 168 e 216 horas para análise da concentração de GA₃.

Na FESS as condições utilizadas foram: 1 L de meio de cultivo (SPC 5% m/v com 20 g/L de sacarose e 0,6 g/L de uréia), taxa de inóculo de 10% v/v, a 29°C e pH inicial 5,0. Amostras foram retiradas 96, 168 e 216 horas para análise da concentração de GA₃.

2.5. Análises

A determinação de GA₃ nas amostras foi realizada pela análise espectrofotométrica a 254 nm (Holbrook, Edge e Baily, 1961).

A determinação de biomassa nas amostras de FSm foi conduzida pelo método de matéria seca, no qual o material foi seco em estufa a 80 °C até massa constante.

As análises do pH foram feitas pelo método potenciométrico. O oxigênio dissolvido no meio de cultivo foi medido por sonda de oxigênio presente do biorreator STR.

3. RESULTADOS

3.1. Escalonamento da produção por FSm para biorreator STR.

Para a produção de GA₃ em biorreator STR, foram utilizadas as condições otimizadas em frascos de Erlenmeyer. As produções de GA₃ obtidas em diferentes condições de aeração e agitação podem ser visualizadas na Tabela 39.

A produção de GA₃ na condição de 300 rpm e 1 L/min iniciou no período entre 24 e 48 horas, o qual correspondente a fase exponencial de crescimento da biomassa. A máxima produção atingida nestas condições foi de 200 mg/L em 120 horas de fermentação. Após 120 horas, a concentração de GA₃ diminuiu para 175 mg/L em 144 horas e então teve um leve aumento para 182 mg/L em 216 horas.

Utilizando 300 rpm e 5 L/min verifica-se que a produção de GA₃ iniciou em um período entre 24 e 48 horas. Após 48 horas de fermentação houve uma oscilação na concentração de GA₃ presente no meio. Essa oscilação já foi observada em etapas anteriores e em trabalhos anteriores de produção de GA₃ utilizando PC (Rodrigues, 2010). A produção máxima foi de 173 mg/L em 96 horas de fermentação. Após 96 horas, a concentração de GA₃ mantém-se entre 111 e 122 mg/L.

Na condição de 500 rpm e 1 L/min, iniciou a produção de GA₃ em um período em 0 e 24 horas de fermentação, o qual corresponde à fase exponencial de crescimento da biomassa. A maior concentração de GA₃ obtida foi de 273 mg/L, a qual ocorreu em 96 horas. Após esse período, a concentração de GA₃ diminui e em 240 horas de fermentação a concentração de GA₃ foi de 198 mg/L.

A produção de GA₃ iniciou em um período entre 48 e 72 horas (300 rpm e 5 L/min), período em que a biomassa está próxima do fim da fase exponencial de crescimento e iniciando a fase estacionária. A produção aumentou até o período de 96 horas, onde correu a concentração de GA₃ (130 mg/L). Após 96 horas, a concentração de GA₃ no meio teve uma diminuição e se manteve entre 109 e 123 mg/L.

Tabela 39. Produção de GA₃ obtida em diferentes condições de agitação e aeração por FSm em STR

Tempo (horas)	300 rpm e 1 L/min	300 rpm e 5 L/min	500 rpm e 1 L/min	500 rpm e 5 L/min
0	0	0	0	0
24	0	0	60	0
48	87	138	155	0
72	110	110	235	90
96	173	173	273	130
120	200	121	230	120
144	175	115	225	110
168	159	119	232	123
192	180	120	221	120
216	182	122	200	118
240	172	111	198	109

Comparando todas as fermentações em STR, a maior produção de GA₃ foi 273 mg/L ou 3,17 g de GA₃/kg de PC seca (produtividade de 2,8 mg/L.h) nas condições de 500 rpm de agitação e aeração de 1 L de ar/min. A menor produção de GA₃ foi de 130 mg/L ou 1,51 g de GA₃/kg de PC seca (produtividade de 1,3 mg/L.h) na condição de 500 rpm de agitação e 5 L de ar/min de aeração. A Tabela 42 apresenta que as maiores produções de GA₃ foram obtidas com taxa de aeração de 1 L de ar/min, indicando que baixas taxas de aeração influenciam positivamente

na produção de GA₃. Machado (2002) e Rodrigues (2010) estudaram a influência da taxa de aeração na produção de GA₃ por FES com planejamentos experimentais e os resultados indicaram que baixas taxas de aeração aumentaram a produção ou a produtividade de GA₃.

Ao comparar a produção em STR e a produção em frasco de Erlenmeyer, tem-se que a maior produção em STR foi 273 mg/L (produtividade de 2,8 mg/L.h) em 96 horas, enquanto que em frascos de Erlenmeyer a maior produção foi de 320 mg/L (produtividade de 0,9 mg/L.h), obtida em 336 horas de fermentação. Em STR tem-se uma maior produtividade de GA₃ de 2,1 mg/L.h a mais que em frascos de Erlenmeyer.

Durán-Páramo, *et al.* (2004) utilizando células livres de *G. fujikuroi* em STR com aeração de 0,3 vvm (1 L de ar/min) e agitação de 200 rpm obteve uma produção de 206 mg/L (produtividade de 0,6 mg/L.h) em 336 horas de fermentação. Utilizando células imobilizadas nas mesmas condições obteve uma produção de 160 mg/L (produtividade de 0,6 mg/L.h) em 264 horas de fermentação. Shukla, Chand, e Srivastava (2005) produziram GA₃ em STR de 3L. As condições de fermentação foram 700 rpm de agitação e 1 vvm (3 L de ar/min) de aeração. A concentração máxima de GA₃ foi 1 g/L (produtividade de 5,9 mg/L.h) em 170 horas de fermentação.

A cinética de crescimento da biomassa em STR pode ser visualizada na Tabela 40. Sob todas as diferentes condições, foi observado que a biomassa não teve fase lag de crescimento. Utilizando a taxa de aeração de 5 L/min, a fase exponencial de crescimento permaneceu até 72 e 96 horas, com 300 rpm e 500 rpm respectivamente. A fase exponencial de crescimento utilizando 5 L/min foi maior que a fase exponencial de crescimento utilizando 1 L/min. A maior concentração de biomassa, 9,51 g/L, foi obtida utilizando 300 rpm e 5 L/min, indicando que maior taxa de aeração estimula o crescimento da biomassa.

Tabela 40. Crescimento de biomassa em diferentes condições de agitação e taxa de aeração em STR

Tempo (horas)	500 rpm e 1 L/min	500 rpm e 5 L/min	300 rpm e 1 L/min	300 rpm e 5 L/min
0	1,06	1	1,15	0,98
24	3,89	2,67	2,12	3,87
48	5,61	4,92	5,05	7,29
72	6,41	7,92	5,49	9,11

96	7	9,11	6,90	9,51
120	7,8	8,81	7,56	8,48
144	7,5	7,51	7,61	9,30
168	7,4	8,03	7,28	8,19
192	6,98	8,81	7,58	8,00
216	7,92	7,51	8,03	8,55
240	7,19	8,03	7,69	8,48

Sob todas as condições de fermentação estudadas, o oxigênio dissolvido diminuiu em uma alta taxa durante a fase exponencial de crescimento da biomassa e então atingiu a concentração mínima, em torno de 2%, durante a fase exponencial de crescimento da biomassa.

Em todas as condições, houve alteração do pH inicial, em torno de 5 para um pH final acima de 8. Essa variação já foi observada em outros estudos (capítulo 2, seção 3.1.3).

3.2. Produção de GA₃ por FSm em BCB

O processo de produção de GA₃ foi igualmente conduzido em BCB utilizando EAPC nas condições otimizadas previamente em frascos de Erlenmeyer. Foram utilizadas três taxas de aeração durante a fermentação, 0,1, 0,5 e 1L de ar/min. Os resultados são apresentados na Tabela 41.

Tabela 41. Produção de GA₃ por FSm em BCB utilizando diferentes taxas de aeração

<i>Taxa de aeração (L de ar/min)</i>	<i>Tempo (horas)</i>	<i>GA₃ (mg/L)</i>
0,1	96	0,0
0,1	168	0,0
0,1	216	74,4
0,5	96	65,3
0,5	168	121,7
0,5	216	168,4
1	96	72,1
1	168	102,7
1	216	203,1

A maior produção de GA₃ foi de 203,1 mg/L, obtida na condição de 1 L/min em 216 horas. Com a aeração na condição de 0,1 L/min (menor taxa aeração testada) obteve-se o menor resultado de GA₃ em 216 horas (74 mg/L). Na condição de 0,500 L de ar/min obteve-se 168,4 mg/L de GA₃ em 216 horas. Este estudo indica que, para BCB maiores taxas de aeração influenciam positivamente na produção de

GA₃. Os estudos realizados em STR indicaram que, a menor taxa de aeração resultou em maior de produção de GA₃.

Chavez-Parga (2008) utilizou um biorreator tipo *air lift* de 3,5 L para produção de GA₃. No biorreator *air lift*, a agitação é pneumática semelhante ao BCB, com a diferença que o *air lift* é composto por um tubo interno na coluna, o qual direciona e organiza o fluxo de ar no sistema. A taxa de aeração utilizada foi 1,6 vvm (5,6 L de ar/min) e a produção de GA₃ obtida foi 100 mg/L (produtividade de 0,3 mg/L.h) em 288 horas de cultivo.

No sistema de BCB, a aeração, além de fornecer oxigênio ao microrganismo, promove a agitação de todo o sistema. A taxa de aeração de 0,1 L/min não conseguiu promover uma agitação suficiente de todo o sistema e, ao longo da fermentação e com o aumento da biomassa, houve um acúmulo da biomassa no fundo da coluna. Na condição de 0,5 L/min também foi observado um acúmulo da biomassa no fundo da coluna. Na condição de 1 L/min, ao longo da fermentação não se observou o acúmulo de biomassa no fundo da coluna, indicando que essa de taxa de aeração promoveu uma agitação suficiente para todo o sistema ao longo da fermentação.

3.3. Produção de GA₃ por FESS em biorreator BCB.

Para FESS em BCB, utilizou-se a SPC otimizado em frascos de Erlenmeyer. Empregaram-se três taxas de aeração durante a fermentação (0,1, 0,5 e 1 L de ar/min. Os resultados são apresentados na Tabela 42.

Tabela 42. Produção de GA₃ por FESS em BCB utilizando diferentes taxas de aeração

Taxa de aeração (L de ar/min)	Tempo (horas)	GA₃ (mg/L)
0,1	96	32,0
0,1	168	68,6
0,1	216	156,9
0,5	96	62,1
0,5	168	96,5
0,5	216	174,8
1	96	75,6
1	168	147,6
1	216	207,7

Obteve-se 207,7 mg/L de GA₃ (produtividade de 0,9 mg/L.h) em 216 horas na condição de 1 L de ar/min, sendo esta a maior produção. As menores concentrações

de GA_3 foram obtidas na condição de 0,1 L de ar/min (156,9 mg/L em 216 horas). A condição de fluxo de 0,5 L de ar/min propiciou uma produção de 174,8 mg de GA_3 /L em 216 horas de fermentação. Como já observado na fermentação submersa, a maior taxa de aeração favoreceu o melhor resultado de produção de GA_3 .

Em relação à agitação do sistema, a condição de fluxo de 0,1 L de ar/min não promoveu uma agitação suficiente do sistema e os grãos de PC presentes depositaram no fundo da coluna (Figura 26A). A condição de fluxo de 1 L de ar/min promoveu uma agitação do sistema suficiente e não houve depósito de partículas sólidas de PC no fundo do biorreator ao longo da fermentação (Figura 26B).

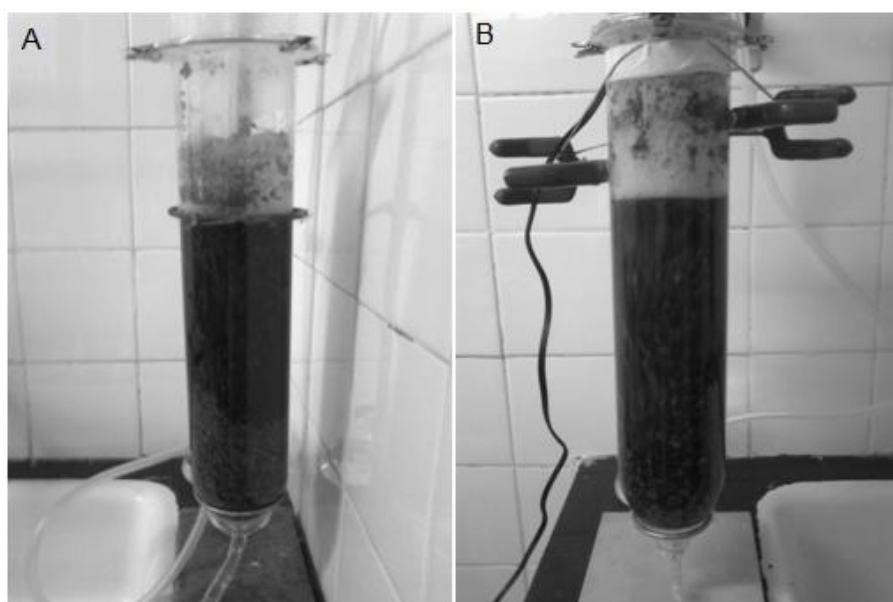


Figura 26. A) Fermentação de SPC em BCB. Condição de aeração 0,1 L de ar/min. B) Fermentação de SPC em BCB. Condição de aeração 1 L de ar/min

3.4. Desenvolvimento do processo de produção de GA_3

O processo de produção de GA_3 envolveu várias etapas de estudos em diferentes tipos de biorreatores (frascos de Erlenmeyer, biorreatores do tipo STR e BCB) e diferentes técnicas de fermentação (FSm e FESS). Um resumo dos melhores resultados obtidos em cada condição e sistema de fermentação é apresentado na Tabela 43.

Tabela 43. Produção de GA_3 por FSm e FESS em diferentes tipos de biorreatores

<i>Tipo de fermentação</i>	<i>Tipo de biorreator</i>	<i>Tempo (horas)</i>	<i>GA_3 (mg/L)</i>	<i>GA_3 (g/kg de PC seca)</i>	<i>Produtividade GA_3 (mg/L.h)</i>	<i>Produtividade GA_3 (g/kg.h)</i>
FSm	Erlenmeyer	336	320	3,72	0,95	0,01

FSm	STR	96	273	3,17	2,84	0,03
FSm	BCB	216	203,1	2,36	0,94	0,01
FESS	Erlenmeyer	240	331	7,69	1,38	0,03
FESS	BCB	216	207,7	4,82	0,96	0,02

Em relação a quantidade de GA₃/PC seca, tem-se que a maior produção foi obtida por FESS em frascos de Erlenmeyer, 7,69 g/kg de PC seca e produtividade de 0,03 g/kg.h. Rodrigues (2010) por FES em frascos de Erlenmeyer produziu 7,6 g/kg de PC seca (produtividade de 0,05 g/kg.h). A produção obtida por FESS é semelhante a produção obtida por FES em termos de GA₃/PC seca. Porém, a produtividade em FES é maior quem FESS, cerca de 1,7 vezes maior. A menor produção foi de 2,36 g/kg de PC seca obtida por FSm em BCB, com uma produtividade de 0,01 g/kg.h.

Ainda que a produção de GA₃ por FES seja equivalente a produção por FESS e superior a produção por FSm, a FSm e a FESS possuem algumas vantagens sobre a FES tais como a facilidade operacional, economia, facilidade no controle de parâmetros operacionais e exige um menor espaço.

4. CONCLUSÃO

A produção de GA₃ em biorreator do tipo STR mostrou um ganho de produtividade em relação à frascos de Erlenmeyer. A maior produção em STR foi 273 mg/L (produtividade de 2,8 mg/L.h) em 96 horas, enquanto que em frascos de Erlenmeyer a maior produção foi de 320 mg/L (produtividade de 0,9 mg/L.h), obtida em 336 horas de fermentação. Em STR tem-se uma maior produtividade de GA₃ de 2,1 mg/L.h a mais que em frascos de Erlenmeyer.

Com o BCB, tanto para EAPC e SPC, a maior produção de GA₃ obtida foi em torno de 200 mg/L (produtividade de 0,9 mg/L.h) em 216 horas de fermentação. De acordo com os resultados, pode-se concluir que a fermentação em STR tem uma maior produção e produtividade de GA₃.

Ao comparar as etapas desenvolvidas no processo de produção de GA₃ neste trabalho com as etapas desenvolvidas por FES, observou-se que, em termos de produção, a quantidade de GA₃ obtida por FESS é semelhante à obtida por FES (7,69 e 7,6 g/kg de PC seca), mas a produtividade da produção obtida por FES é 1,67 vezes maior que a obtida por FESS.

CAPÍTULO 4

PURIFICAÇÃO DO GA₃ PRESENTE NO CALDO FERMENTADO DE POLPA CÍTRICA

RESUMO

O caldo fermentado é formado por misturas complexas de componentes que contém o(s) produto(s) de interesse. Para se obter o produto purificado, há a necessidade de realizar uma série de etapas conhecidas como operações unitárias. Durante o processo fermentativo de produção do GA₃, outras giberelinas podem estar presentes no caldo fermentado tais como GA₁, GA₄, GA₇, GA₁₃ e o GA₃-isolactona. O GA₃ pode ser recuperado do caldo fermentado através de processos de adsorção, extração líquido-líquido e através de métodos cromatográficos. Neste capítulo será apresentada a purificação do GA₃ do caldo fermentado bem como a análise do GA₃ por cromatografia líquida de alta eficiência. O GA₃ foi purificado por processos de filtração, precipitação de macromoléculas, clarificação em carvão ativado, extração líquido-líquido, concentração e cristalização. As frações obtidas após as etapas de precipitação de macromoléculas (EF), clarificação em carvão ativado (EC) e cristalização foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A análise do EF por CLAE mostrou que além do GA₃ há presença de outros componentes e com pouca separação entre eles. Deste modo, a quantificação de GA₃ por CLAE no EF não é adequada. Na análise do EC por CLAE, verificou-se que houve uma purificação do GA₃, pois o cromatograma apresentou somente dois picos definidos, sendo um deles o GA₃. Os cristais de GA₃ obtidos são pequenos e incolores e no cromatograma pode-se observar a presença de somente um pico, semelhante ao pico do padrão de GA₃ analisado nas mesmas condições.

Palavras chave: purificação, cristalização, CLAE

1. INTRODUÇÃO

O caldo fermentado é formado por misturas complexas de componentes que contém o(s) produto(s) de interesse em soluções diluídas. As etapas individuais do processo que alteram ou separam os componentes de um determinado meio são conhecidas como operações unitárias, as quais, em um caldo fermentado, possuem o objetivo de concentrar e purificar o produto desejado para venda (Doran, 1998).

Para cada produto desejado, o processo de recuperação será diferente, mas geralmente, ao processo de recuperação de um produto segue uma sequencia geral de etapas, as quais são: separação de células, tratamento primário, purificação e tratamento final.

A separação de células consiste em remover as células do caldo fermentado. As operações utilizadas para remover as células são a filtração e a centrifugação. O

tratamento primário consiste em remover componentes cujas propriedades diferem consideravelmente das do produto desejado. As operações básicas utilizadas são a adsorção, a extração líquida e a precipitação. Os processos de purificação são muito seletivos e separam o produto das impurezas presentes no caldo que apresentam características semelhantes ao produto. As operações utilizadas são a cromatografia, a ultrafiltração e a precipitação fracionada. No tratamento final, a pureza final requerida do produto depende de sua aplicação. Geralmente são utilizados processos de cristalização seguida de uma centrifugação ou filtração para recuperação dos cristais obtidos (Doran, 1998).

Durante o processo fermentativo de produção do GA₃, outras giberelinas podem estar presentes no caldo fermentado tais como GA₁, GA₄, GA₇, GA₁₃ e o GA₃-isolactona, o qual é biologicamente inativo (Rachev *et al.*, 1993). O GA₃ pode ser recuperado do caldo fermentado através de processos de adsorção ou pela extração com solventes e então purificado por repetidas extrações líquido-líquido e então, concentrado sob condição de vácuo. Enfim um produto em pó ou cristalino é obtido (Shukla, Srivastava e Chand, 2003). A separação de giberelinas individuais tem sido realizada também através de colunas de sílica gel e sephadex LH20, por cromatografia de alta eficiência (CLAE) e cromatografia de camada delgada (Rachev *et al.*, 1993).

Durante o processo fermentativo, diferentes GA_s são sintetizadas. Métodos rápidos e simples foram desenvolvidos para analisar o GA₃ (Berríos, Illanes e Aroca, 2004). Dentre os métodos utilizados, há a análise espectrofotométrica e a análise por CLAE.

O método espectrofotométrico baseia-se na conversão do GA₃ em ácido giberelênico, pela ação de ácidos fortes. A absorbância do ácido giberelênico é medida em 254 nm (Holbrook, Edge e Baily, 1961). É um método rápido e específico para o GA₃, rotineiramente utilizado para a análise de caldos fermentados.

A CLAE promove separação de diferentes tipos de giberelinas com boa resolução, incluindo isômeros, além de uma quantificação precisa, sendo potencialmente atrativo para esses fitohormônios polares e termicamente lábeis. Os detectores de UV têm sido utilizados em CLAE para a separação de fitohormônios em amostras de plantas (Barendse e Van de Werken, 1980; Sandberg *et al.*, 1987; Lin *et al.*, 1991; Dobrev *et al.*, 2005). Dois tipos de colunas podem ser utilizadas, a μ Bondapak C18 e Radial-Pak-A. A fase móvel consiste de na maioria das vezes,

metanol-água destilada acidificada com ácido fosfórico em pH 3, com detecção a 203 ou 206 nm (Machado, 2002).

O objetivo desta etapa do trabalho foi purificar e analisar o GA₃ do caldo fermentado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado no presente trabalho foi a *Gibberella fujikuroi* LPB-06, obtida do banco de cepas do Laboratório de Processos Biotecnológicos I (LPB-I), da Divisão de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, da Universidade Federal do Paraná.

A cepa foi mantida em meio PDA (*Potato Dextrose Agar*) a 4 °C e sendo repicada a cada 3 meses.

2.2. Substrato

Foi utilizado a PC, um subproduto da agroindústria brasileira, como substrato para produção de GA₃. A PC foi fornecida pela empresa Coalma Comércio de Produtos para Alimentação Animal, na forma de *pellets*, os quais foram triturados e classificados na granulometria menor que 5 mm.

A PC foi mantida na forma sólida a temperatura ambiente e o EAPC foi preparado no momento do uso. O EAPC foi obtido utilizando 5 g de PC moída (granulometria menor que 5 mm) em 50 mL de água. Essa suspensão foi levada a ebulição por 30 minutos em banho-maria e então filtrada para remoção dos sólidos suspensos (Rodrigues, 2010).

O ESSPC foi obtido misturando 5 g de PC, com tamanho entre 2 e 2,8 mm, com 100 mL de solução contendo 20 g/L de sacarose e 0,6 g/L de uréia. Essa suspensão foi esterilizada em autoclave por 15 minutos a 121°C.

2.3. Preparo do inóculo de *G. fujikuroi* LPB-06

A cepa de *G. fujikuroi* LPB-06 foi cultivada em tubo de ensaio contendo meio PDA inclinado e incubada a 30 °C por 7 dias. O micélio foi raspado do meio PDA com auxílio de uma alça de níquel e então inoculado nos frascos Erlenmeyer de 250

mL contendo 50 mL de meio a base de EAPC a 5 %. O cultivo foi conduzido a 29 °C sob agitação de 120 rpm por 96 horas.

2.4. Produção de GA₃ por FESS

A fermentação ocorreu em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL do ESSPC. O ESSPC contém 5 % de PC (m/v), 20 g/L de sacarose, 0,6 g/L de uréia e pH 5,6. Foi utilizada uma taxa de inoculação de 10% (v/v).

A fermentação foi conduzida a 29°C, sob agitação de 120 rpm por 168 horas.

2.5. Purificação do GA₃ e análise por CLAE

A purificação do GA₃ foi realizada segundo a metodologia utilizada por Rodrigues (2010). As etapas realizadas para purificação do GA₃ produzido por FESS estão apresentadas no fluxograma da Figura 27.

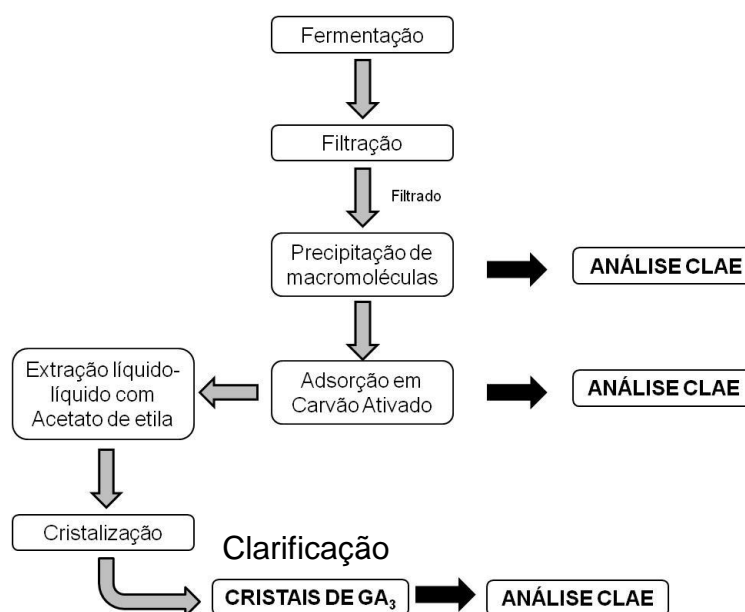


Figura 27. Fluxograma do processo de purificação do GA₃ do caldo fermentação.

O caldo fermentado foi filtrado para remoção da biomassa e, em seguida, realizou-se uma precipitação para remoção de macromoléculas. Para precipitação foram utilizados 15 mL do filtrado e adicionou-se 5 mL de etanol, 1 mL da solução de Carrez 1 (acetato de zinco a 30 %), 1 mL da solução de Carrez 2 (ferrocianeto de potássio a 15 %). O volume foi completado para 25 mL com água deionizada. O material foi filtrado para remoção do precipitado e no líquido clarificado foi feita a análise de GA₃ por espectrofotometria e por CLAE.

Para a clarificação do extrato fermentado, foi utilizado um carvão ativado na forma de pó (referência C118-CB), o qual foi gentilmente fornecido pela empresa Carbomafra S/A. Foram utilizados 30 g de carvão ativado, que foram empacotados em uma coluna de vidro de 48 mm de diâmetro com altura de carvão ativado de 70 mm. A coluna foi lavada com água deionizada e então 500 mL do extrato foram percolados pela coluna com auxílio de uma bomba peristáltica a uma vazão de 80 mL/min. Em seguida, a coluna foi lavada com água deionizada (Rodrigues, 2010).

O extrato clarificado (passado pelo carvão ativado) teve o pH abaixado para 1,5 com HCl 0,1 N e então foi adicionado acetato de etila na proporção 1:1 (v:v) em um funil de separação. A mistura foi agitada e então ficou em repouso até a fase contendo solvente orgânico separar da fase aquosa. A fase de acetato de etila foi recolhida e então foram realizadas mais duas extrações com acetato de etila nas mesmas condições descritas acima (Rodrigues, 2010).

As amostras após extração com acetato de etila foram concentradas até aproximadamente 1/10 do volume inicial e, em seguida acondicionadas em um copo de Becker a temperatura entre 4 e 10 °C para que houvesse cristalização do GA₃.

2.6. Análises

A análise do GA₃ por espectrofotometria e por CLAE foram realizadas no extrato após a etapa de precipitação de macromoléculas e no extrato clarificado.

A análise espectrofotométrica utilizada consiste na acidificação do extrato com HCl 3,7 M durante 60 a 80 min a 20 °C e analisado a 254 nm (Holbrook, Edge e Bailey, 1961).

Nas análises realizadas em CLAE, foram utilizadas 20 µL da amostra e a eluição foi feita com uma mistura de solvente A (metanol) e solvente B (água com pH 3,0 acidificada com ácido fosfórico) com fluxo de 1,00 mL/min. A coluna utilizada foi a C-18 a temperatura ambiente e detector de UV a 210 nm. A análise foi realizada em comparação ao padrão de GA₃ (99% de pureza) nas mesmas condições das amostras (Rodrigues, 2010).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3. Análises do extrato fermentado e do extrato clarificado por CLAE

Para análise de GA₃ por CLAE, o extrato fermentado foi clarificado a fim de se obter cromatogramas com picos separados e definidos. As amostras analisadas por CLAE foram do extrato fermentado (EF) obtido após a etapa de precipitação de macromoléculas, do extrato clarificado (EC) obtido após a etapa de passagem pela coluna de carvão ativado e dos cristais de GA₃. O resultado da análise do EF e do EC por CLAE é apresentado na Figura 28.

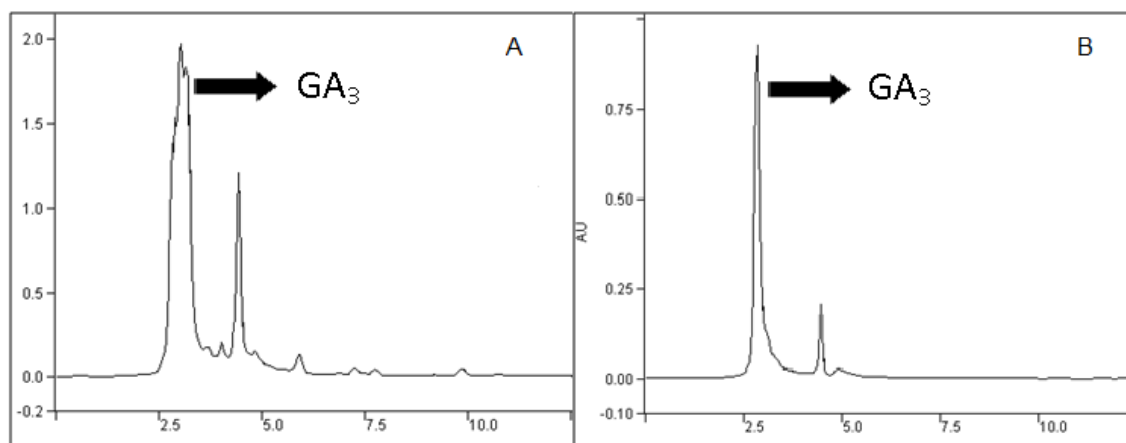


Figura 28. Análise por CLAE. À esquerda (A) está representado o cromatograma obtido do EF e à direita (B) está representado o cromatograma obtido do EC

O cromatograma da análise do EF mostra que, além do GA₃ há presença de outros componentes com pouca separação entre eles. Deste modo, a quantificação de GA₃ por CLAE no extrato fermentado não é adequada.

No EC observa-se que, em relação ao EF, houve uma limpeza efetiva após a passagem pela coluna de carvão ativado. Essa limpeza pode ser observada no cromatograma obtido do EC em que há a presença de dois picos separados e definidos, sendo que um deles é o pico do GA₃ (pico indicado na Figura 28). A diferença visual entre o EF e o EC e a eficiência de limpeza do EC pela coluna de carvão ativado pode ser visualizada na Figura 29.



Figura 29. Extrato fermentado (esquerda) e extrato clarificado (direita).

FONTE: A Autora.

A análise de componentes através da CLAE oferece resultados reais quando existe uma boa separação entre os picos referentes aos componentes da amostra. Em extratos fermentados nos quais há uma grande quantidade de compostos, esta técnica fica vinculada a uma limpeza e preparo rigoroso da amostra, além do desenvolvimento da metodologia de análise. Deste modo, utilizou-se a metodologia de análise de GA_3 no EF por espectrofotometria até esta etapa dos estudos. A metodologia de espectrofotometria utilizada é específica para a análise de GA_3 , sendo bastante útil quando se tem um grande número de análises a realizar (Rodrigues, 2010).

A análise quantitativa do GA_3 no EF e no EC é apresentada na Tabela 44, em que para a condição utilizada na coluna de carvão (30 g de carvão para 500 mL de extrato e vazão de 80 mL/min) houve recuperação de 58 % de GA_3 . Esse resultado indica que parte do GA_3 foi adsorvido pelo carvão ativado. Essa porcentagem de recuperação de GA_3 , utilizando o carvão ativado, foi próxima a obtida por Rodrigues (2010), a qual obteve 63 % de recuperação de GA_3 .

Tabela 44. Concentração de GA_3 por espectrofotometria no EF e no EC e porcentagem de recuperação do GA_3 .

<i>Extrato fermentado (Concentração de GA_3)</i>	<i>Extrato clarificado (Concentração de GA_3)</i>	<i>Recuperação de GA_3</i>
200 mg/L	116 mg/L	58 %

No extrato clarificado foi realizada uma extração líquido-líquido com acetato de etila. A fração contendo o acetato de etila foi recuperada e foi concentrada para

posterior cristalização em baixa temperatura (4-10°C). Os cristais obtidos foram re-suspendidos com etanol e analisados por CLAE para verificar a pureza do GA₃ (Figura 30).

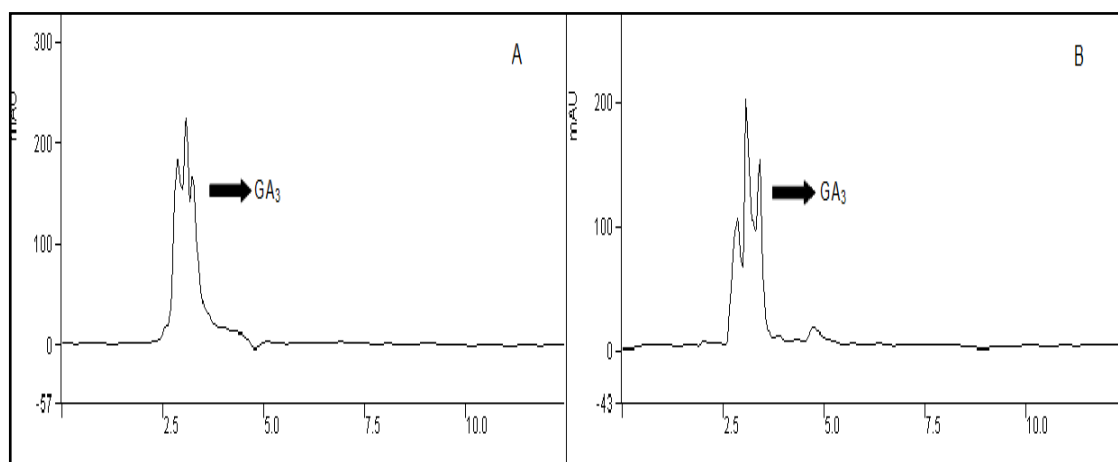


Figura 30. Análise de GA₃ por CLAE. À esquerda (lado A) está apresentado o cromatograma do cristal obtido após a etapa de purificação e à direita (lado B) está apresentado o cromatograma do padrão de GA₃ 99% de pureza da marca Sigma a 0,1 g/L ambos dissolvidos em etanol.

Nesta análise os cristais obtidos de 200 mL de extrato clarificado, foram solubilizados em etanol e analisados. Foi observada a presença de três picos não separados o que talvez pudesse ser devido à baixa concentração do analito já que nessas condições as interações que ocorrem entre o analito, a fase móvel e a fase estacionária se apresentam mais evidentes. Assim, foi escolhida uma concentração baixa de padrão (0,1 g/L) para que se pudesse observar se este efeito também ocorreria em uma amostra pura (99%), o que realmente foi observado (Figura 30 B). Desta forma com a análise do cromatograma dos cristais obtidos, observa-se que o processo de purificação do GA₃ foi efetivo.

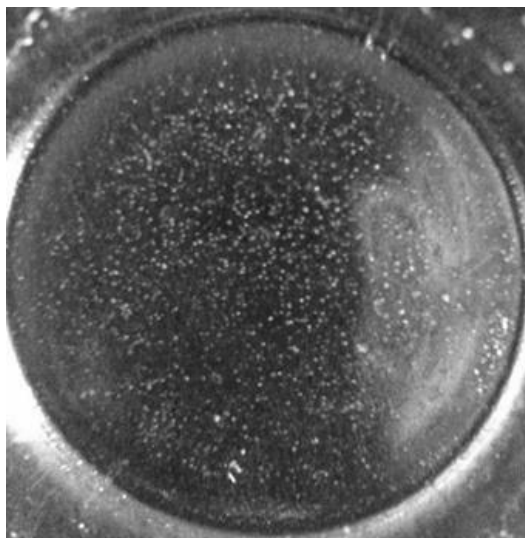


Figura 31. Cristais de GA₃ obtidos após a purificação do extrato fermentado.

FONTE: A Autora.

Neste trabalho, as condições de cristalização utilizadas não foram otimizadas e não houve agitação durante o processo cristalização (por resfriamento). Os cristais obtidos são pequenos e brancos (Figura 31). Rachev *et al.* (1993) purificaram o GA₃ de um caldo fermentado e após a extração líquido-líquido obtiveram cristais brancos com pureza de 75%.

4. CONCLUSÃO

O processo de purificação do extrato fermentado foi efetivo para remoção dos contaminantes presentes e, ao final do processo obtiveram-se cristais de GA₃. Os extratos obtidos durante o processo de purificação foram analisados por CLAE e nos cromatogramas obtidos pode-se observar a remoção dos contaminantes. Ao realizar a análise do padrão de GA₃ 99% pode-se comprovar que o cristal purificado corresponde ao GA₃.

A análise do EF por CLAE mostrou que a quantificação do GA₃ neste meio é impossibilitada devido a presença de contaminantes na amostra que não puderam ser separados nas condições utilizadas. Desta forma faz-se necessário uma clarificação da amostra para quantificar o GA₃ por CLAE. Para o EF a quantificação por método espectrofotométrico mostrou-se assim, continuar sendo a mais adequada.

CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho realizou-se o estudo da produção de GA₃ por fermentação submersa e fermentação no estado semissólido, utilizando a PC como substrato pré-tratado. Utilizou-se o extrato aquoso de polpa cítrica (EAPC) e a suspensão de polpa cítrica (SPC).

A cepa *Gibberella fujikuroi* LPB-06 foi escolhida dentre as cepas existentes no banco de cepas LPB, pois produziu a maior quantidade de GA₃ em meio líquido sintético ICI, 248,9 mg/L de GA₃.

O EAPC foi selecionado como substrato para produção de GA₃ por fermentação submersa. A maior produção obtida foi de 150 mg/L (produtividade de 1,2 mg/L/h) em 120 horas (5 dias) de fermentação. Pode-se destacar a substituição de um meio sintético por um meio a base de um subproduto da agroindústria com baixo valor agregado.

Após as etapas de otimização com o emprego de planejamentos experimentais, houve aumento na produção de GA₃. Em fermentação submersa (FSm) houve um ganho de 113% em relação à condição inicial de fermentação sendo a maior concentração de GA₃ obtida de 320 mg/L (3,7 g de GA₃/kg de PC seca) em 336 horas de fermentação. As condições empregadas neste caso foram: EAPC 10% (10% m/v de PC seca no extrato), pH 5,5 (natural da PC), 10% v/v de taxa de inóculo e 0,5 g/L de MgSO₄, a 29 °C e 120 rpm. Em fermentação semissólida utilizando a SPC, o ganho foi de 85% em relação à condição inicial de fermentação. Obteve-se uma concentração de GA₃ de 331 mg/L (7,7 g de GA₃/kg de PC seca) utilizando 5% m/v de PC na SPC, granulometria da PC de 2 a 2,8 mm, 20 g/L de sacarose, 0,6 g/L de uréia, 0 29 °C e 120 rpm.

Ao comparar a produção de GA₃ nos dois sistemas de fermentação, observa-se que há pouca diferença entre concentração de GA₃ obtida em relação ao volume do fermentado (320 mg/L em FSm e 331 mg/L em FESS). Essa produção obtida, em relação à massa seca de PC adicionada no extrato, observa-se que em FESS como SPC obteve-se o dobro de produção de GA₃ em relação à FSm utilizando o EAPC (7,7 g de GA₃/kg de PC seca por FESS com SPC e 3,7 g de GA₃/kg de PC seca por FSm com EAPC).

Com o escalonamento da produção em EAPC de frascos de Erlenmeyer para STR, houve um ganho de produtividade em relação à produção em frascos de

Erlenmeyer. Esse aumento deve-se ao fato de que no STR a velocidade de agitação ser maior e haver aeração forçada. A maior produção em STR foi 273 mg/L (produtividade de 2,8 mg/L.h) em 96 horas, enquanto que em frascos de Erlenmeyer a maior produção foi de 320 mg/L (produtividade de 0,9 mg/L.h), obtida em 336 horas de fermentação. Em STR tem-se uma maior produtividade de GA₃ de 2,1 mg/L.h a mais que em frascos de Erlenmeyer.

O escalonamento da produção de frascos de Erlenmeyer para biorreator do tipo BCB, tanto com o EAPC como com a SPC, a maior produção de GA₃ obtida foi de 200 mg/L em 216 horas de fermentação, com taxa de aeração de 1 L/min. Essa taxa de aeração promoveu uma maior agitação do meio durante a fermentação.

Este trabalho teve resultados que são promissores principalmente utilizando a técnica de fermentação no estado semissólido, pois os estudos de aumento de escala para biorreatores STR e BCB não foram concluídos. Há perspectivas de aumento de produção e melhora na produtividade de GA₃ assim como a obtenção dos produtos a base de GA₃ em pó (cristal) e líquido.

PERSPECTIVAS

Os resultados deste trabalho foram bastante promissores, pois apresentam perspectivas de seqüência dos estudos para formulação de um novo produto. Deste modo, os estudos a serem realizados para dar continuidade são apresentados a seguir:

- Aumento de escala do processo de produção de GA₃ por FESS de frascos de Erlenmeyer para biorreator STR.
- Estudo de diferentes modos de fermentação em STR como a batelada alimentada.
- Melhoramento genético do fungo selecionado como bom produtor de GA₃ em fermentação submersa e fermentação no estado semissólido.
- Estudos de processo de concentração, clarificação e purificação do GA₃.
- Formulação de diferentes produtos a base de GA₃ produzido por fermentação utilizando polpa cítrica.
- Aplicação dos produtos obtidos em campo.
- Modelagem matemática do processo de produção de GA₃, envolvendo todas as variáveis significativas.
- Estudo econômico dos custos de produção dos produtos obtidos.

As etapas de melhoramento genético do fungo e estudos de purificação do GA₃ estão em andamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCANCE PECUÁRIA. Disponível em: http://www.alcancepecuaria.com.br/produtos.php?id_categoria=2. Acesso em 06 de fevereiro de 2012.
- ALEXOPOULOS, A.A.; AKOUMIANAKIS, K.A.; VEMMOS, S.N.; PASSAM, H.C. (2007). The effect of postharvest application of gibberellic acid and benzyl adenine on the duration of dormancy of potatoes produced by plants grown from TPS. *Postharvest Biology and Technology*, 46: 54–62.
- AL-WHAIBI, M.H.; SIDDIQUI, M.H.; AL-AMRI, A.; BASALAH, M.O. (2010). Performance of faba bean under calcium and gibberellic acid application. *International Journal of Plant Developmental Biology* 4, 1: 60–63.
- ARAKAKI, A. H. (2010). Desenvolvimento de bioprocesso para produção de biomassa rica em cobre e zinco por fermentação submersa utilizando leveduras isoladas do baru (*Dipteryx alata* vog.) e testados em resíduos da agroindústria brasileira. Tese de doutorado em Processos Biotecnológicos - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE MANDIOCA (ABAM). Disponível em: <http://www.abam.com.br/revista/revista14/manipueira.php>. Acesso em 20 de janeiro de 2012.
- ATES, S.; OZENIR, S.; GÖKDERE, M. (2006). Effect of Silicone Oil on Gibberellic Acid Production by *Gibberella fujikuroi* and *Aspergillus niger*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42: 500-501.
- BALDWIN, E.A. (2003). Coatings and other supplemental treatments to maintain vegetable quality. In: Bartz J, Brecht J (Eds), *Postharvest Physiology and Pathology of Vegetables*. Marcel Dekker, New York, 413–435.
- BANDELIER, S.; RENAUD, R.; DURAND, A. (1997). Production of gibberellic acid by fed-batch solid state fermentation in an aseptic pilot-scale reactor. *Process Biochemistry*, 32: 141–145.
- BARENDSE, G.W.M.; VAN DE WERKEN, P.H. (1980). High-Performance Liquid Chromatography of Gibberellins. *Journal of Chromatography*, 198: 449–455.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. (1995). Planejamento e otimização de experimentos. 2 ed. Campinas: Ed. UNICAMP, 299 p.
- BAUMGARTNER, S.; SHAH, D.; SCHALLER, J.; KÄMPFER, U.; THURNEYSSEN, A.; HEUSSER, P. (2008). Reproducibility of dwarf pea shoot growth stimulation by homeopathic potencies of gibberellic acid. *Complementary Therapies in Medicine*, 16: 183–191.
- BAVIERA, B.; JUAN, M.; ALMELA, V.; GARIGLIO, N.; AGUSTÍ, M. (2002). La inhibición de la floración en el melocotonero (*Prunus pérsica* L. Batsch.) como técnica indirecta de aclareo de frutos. *Fruticultura Profesional*, 125: 15–28.
- BERRÍOS, J.; ILLANES, A.; AROCA, G. (2004). Spectrophotometric method for determining gibberellic acid in fermentation broths. *Biotechnology Letters*, 26: 67–70.
- BERRIOS, J.; PYLE, D.L.; AROCA, G. (2010). Gibberellic acid extraction from aqueous solutions and fermentation broths by using emulsion liquid membranes. *Journal of Membrane Science*, 348: 91–98.

- BIASI, L. A.; ZANETTE, F. (2000). Ácido giberélico isolado ou associado com cera na conservação pós-colheita da lima ácida "Tahiti". *Scientia Agraria*, 1: 39-44.
- BILKAY, I.S.; KARAKOÇ, S.; AKSÖZ, N. (2010). Indole-3-acetic acid and gibberellic acid production in *Aspergillus niger*. *Turkish Journal of Biology*, 34: 313–318.
- BIRKEMEYER, C.; KOLASA, A.; KOPKA, J. (2003). Comprehensive chemical derivatization for gas chromatography-mass spectrometry-based multi-targeted profiling of the major phytohormones. *Journal of Chromatography A*, 993: 89-102.
- BÖMKE, C.; TUDZYNSKI, B. (2009). Diversity, regulation, and evolution of the gibberellin biosynthetic pathway in fungi compared to plants and bacteria. *Phytochemistry*, n. 70, p. 1876–1893.
- BORGHETTI, I.A. (2009). Avaliação do crescimento da microalga *Chlorella minutissima* em meio de cultura com diferentes concentrações de manipueira. Curitiba, Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.
- BORROW, A.; BROWN, S.; JEFFERYS, E.G.; KESSEL, R.J.H.; LLOYD, E.C.; LLOYD, P.B. (1964). The kinetics of metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture. *Canadian Journal of Microbiology*, 10: 407–444.
- BOTELHO, R.V.; PIRES, E.J.P.; TERRA, M.M. (2003). Efeitos do thidiazuron e do ácido giberélico nas características dos cachos e bagas de uvas 'niagara rosada' na região de Jundiaí-SP. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 25:96–9.
- BRASIL DEFENSIVOS. Disponível em: <http://www.brasildefensivos.com.br>. Acesso em: 18 de janeiro de 2012.
- BRUCKNER B., BLECHSCHMIDT D. (1991). The gibberellin fermentation. *Critical Reviews in Biotechnology*, 11: 163-192.
- BUCHANAN B.B., GRUISSEM W., JONES R.L. (Eds.) (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists.
- CANDAU, R.; AVALOS, J.; CERDÁ-OLMEDO, E. (1991). Gibberellins and carotenoids in the wild type and mutants of *Gibberella fujikuroi*. *Applied and environmental microbiology*, 57:3378–82.
- CANDAU, R.; AVALOS, J.; CERDÁ-OLMEDO, E. (1992). Regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *Plant Physiology*, 100:1184–88.
- CARVALHO J.C., PANDEY A., OISHI B.O., BRAND D., RODRIGUEZ-LEON J.A., SOCCOL C.R. (2006). Relation between growth, respirometric analysis and biopigments production from *Monascus* by solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 29: 262–269.
- CEPEA - CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA - ESALQ/USP. Disponível em: <http://www.cepea.esalq.usp.br/pib/>. Acesso em: 28 de fevereiro de 2012.
- CHANG, J.C.; LIN, T.S. (2006). GA3 increases fruit weight in 'Yu Her Pau' litchi. *Scientia Horticulturae*, 108:442–43.
- CHAVEZ-PARGA, M.C.; GONZALEZ-ORTEGA, O.; NEGRETE-RODRÍGUEZ, M.L.X.; VALLARINO, I.G.; ALATORRE, G.G.; ESCAMILLA-SILVA E.M. (2008). Kinetic of the gibberellic acid and bikaverin production in an airlift bioreactor. *Process Biochemistry*, 43:855–860.

CHIMELLI, M. (2003). Obtenção de giberelinas por biotransformação fúngica do esteviosídeo: etapa de deglicosilação. Tese de Doutorado em Processos Biotecnológicos - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

CITRUS BR. Disponível em: <http://www.citrusbr.com/exportadores-citricos/setor/producao-192415-1.asp>. Acesso em 06 de fevereiro de 2012.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento, dezembro/2011. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_12_08_11_00_54_08.pdf. Acesso em 20 de janeiro de 2012.

CORONA, A.; SANCHEZ, D.; AGOSTIN, E. (2005). Effect of water activity on gibberellic acid production by *Gibberella fujikuroi* under solidstate fermentation conditions. *Process Biochemistry*, 40: 2655–2658.

CROW, J.R.; THOMSON, R.J.; MANDER, L.N. (2006). Synthesis and confirmation of structure for the gibberellin GA131 (18-hydroxy-GA4). *Organic Biomolecular Chemistry*, 4:32–2544.

CUTRALE. Disponível em: <http://www.cutrale.com.br/cutraleHome/index.jsp?link=99&tab=13>. Acesso em 16 de maio de 2012.

DARKEN, M.A.; JENSEN, A.L.; SHU, P. (1959). Production of gibberellic acid by fermentation. *Applied Microbiology*, 7:301–303.

DAVIES P.J. (Ed.) (2004). *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!*, Kluwer Academic, Netherlands.

DE MALACH, J.G.; SACHS, M.; ROTEM, R. (1976). Timing and Optimal Concentration of Gibberellic Acid Treatments for Forcing Yield of Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Edizioni Minerva Medica*. Turin, Italy, 633–642.

DIAZ, A.; ACEVEDO, F. (1999). Scale-up strategy for bioreactors with Newtonian and non-Newtonian broths. *Bioprocess Engineering*, 21: 21-23.

DOBREV, P.I.; HAVLICEK, L.; VAGNER, M.; MALBECK, J.; KAMINEK, M. (2005). Purification and determination of plant hormones auxin and abscisic acid using solid phase extraction and two-dimensional high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1075: 159–66.

DORAN, P. (1995). *Bioprocess Engineering Principles*. Academic Press, 439p.

DURÁN-PÁRAMO, E.; MOLINA-JIMÉNEZ, H.; BRITO-ARIAS, M. A.; ROBLES-MARTÍNEZ, F. (2004). Gibberellic Acid Production by Free and Immobilized Cells in Different Culture Systems. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 113–116:381-388.

ECONOMOU, C.N.; MAKRI, A.; AGGELIS, G.; PAVLOU, S.; VAYENAS, D.V. (2010). Semi-solid state fermentation of sweet sorghum for the biotechnological production of single cell oil. *Bioresource Technology*, 101: 1385–1388.

EL-OTMANI, M.; COGGINS, C.W.; AGUSTÍ, M.; LOVATT, C.J. (2000). Plant growth regulators in citriculture: World current uses. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19: 395–447.

ESCAMILLA, E. M.; DENDOOVEN, L.; MAGAÑA, I. P.; PARRA, R.; DE LA TORRE, M. (2000). Optimization of gibberellic acid production by immobilized *Gibberella fujikuroi* mycelium in fluidized bioreactors *Journal of Biotechnology*, 76: 147-155.

- ESCHEL, D.; BEN-ARIE, R.; DINOOR, A.; PRUSKY, D. (2000). Resistance of gibberellin-treated persimmon fruit to *Alternaria alternata* arises from the reduced ability of the fungus to produce endo-1,4- β glucanase. *Phytopathology*, 90:1256–1262.
- FERRI, V. C.; RINALDI, M. M.; SILVA, J. A.; LUCHETTA, L.; MARINI, L.; ROMBALDI, C. V. (2004). Ácido giberélico no retardamento da maturação de caquis (*Diospyrus kaki*, L.), cultivar Fuyu. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas. 24(1): 1-5.
- FOURY C. (1977). Trials on gibberellic acid application to spring crop of globe artichoke (*Cynara scolymus*) cv. Blanc Hyerois. *Annales de L'Amelioration des Plantes*, 27: 411–426.
- FUSKA, J.; KUHR, I.; PODOJIL, M.; SEVCIK, V. (1961). The influence of the nitrogen source on the production of gibberellic acid in submerge cultivation of *Gibberella fujikuroi*. *Folia Microbiologica*, 6: 18.
- GANCHEVA, V.; DIMOVA, T.S.; KAMENOV, K.E.; FOUTEKOVA, M. (1984). Biosynthesis of gibberellins. III. Optimization of nutrient medium for biosynthesis of gibberellins upon using mathematical methods for planning the experiments. *ACTA Microbiologica Bulgarica*, 14: 80.
- GARCIA, S.M.; FIRPO, I.T.; ANIDO, F.S.L.; COUNTRY, E.L. (1999). Application of gibberellic acid in globe artichoke. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 34:789–93.
- GELMI, C.; PÉREZ-CORREA, R.; GONZÁLEZ, M.; AGOSIN, E. (2000). Solid substrate cultivation of *Gibberella fujikuroi* on an inert support. *Process Biochemistry*, 35:1227–1233.
- GELMI, C.; PEREZ-CORREA, R.; AGOSTIN, E. (2002). Modeling *Gibberella fujikuroi* growth and GA₃ production in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 37:1033–1040.
- GONZÁLEZ-ROSSIA, D.; JUAN, M.; REIG, C.; AGUSTI, M. (2006). The inhibition of flowering by means of gibberellic acid application reduces the cost of hand thinning in Japanese plums (*Prunus salicina* Lindl.). *Scientia Horticulturae*, 110:319–323.
- GONZÁLEZ-ROSSIA D, REIG C, JUAN M, AGUSTI M (2007). Horticultural factors regulating effectiveness of GA₃ inhibiting flowering in peaches and nectarines (*Prunus persica* L. Batsch). *Scientia Horticulturae*, 111:352–57.
- GOHLWAR, C.S.; SETHI, R.P.; MARWAHA, S.S. (1984). Gibberellic-acid biosynthesis from whey and simulation of cultural parameters. *Enzyme and Microbial Technology*, 6:312–16.
- HEROPOLITANSKI, R.; KOMINIÁK, J.M.; MACHALOWSKA, M. (1994). Method of isolating gibberellins from aqueous solutions. Patent No PL163,608.
- HOLBROOK, A.; EDGE, W.; BAILEY, F. (1961). Spectrophotometric method for determination of gibberellic acid. *Advances in Chemistry Series*, 28:159–67.
- HOLME, T.; ZACHARIA, B. (1965). Gibberellic Acid Formation In Continuous Culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 7: 405–412.
- IBGE. Banco de dados agregados. Disponível em: www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf. Acesso em 17 de maio de 2012.
- INSTITUTO CUBANO DE PESQUISA DOS DERIVADOS DA CANA-DE-AÇÚCAR (ICIDCA). (1999). Manual dos derivados da cana-de-açúcar: diversificação, matérias-

primas, derivados do bagaço, derivados do melaço, outros derivados, resíduos, energia. Brasília: ABIPTI.

JEFFERYS, E. G. The gibberellin fermentation *Advances in Applied Microbiology*, 13, 283-316, 1970.

KANTARCIA, N.; BORAK, F.; ULGEN, K. O. (2005). Bubble column reactors. *Process Biochemistry*, 40: 2263–2283.

KARP, S.G. (2007). Production of l-lactic acid from the soybean vinasse. Curitiba, Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

KAWAGOE, K.; INOUE, T.; NAKAO, K.; OTAKE, T. (1976). Flow-pattern and gas holdup conditions in gas-sparged contactors. *Int J Chem Eng*, 16:176–183.

KHAN, M.N.; SIDDIQUI, M.H.; MOHAMMAD, F.; NAEEM, M.; KHAN, M.M.A. (2010). Calcium chloride and gibberellic acid protect linseed (*Linum usitatissimum* L.) from NaCl stress by inducing antioxidative defence system and osmoprotectant accumulation. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32:121–132.

KINAY, P.; YILDIZ, F.; SEN, F.; YILDIZ, M.; KARACALI, I. (2005). Integration of pre- and postharvest treatments to minimize *Penicillium* decay of Satsuma mandarins. *Postharvest Biology and Technology*, 37: 31–6.

KNOWLEDGE BANK. Disponível em: http://www.knowledgebank.irri.org/smta/index.php?option=com_content&view=article&id=267&catid=35&Itemid=84. Acesso em 12 de fevereiro de 2012.

KUMAR, P. K. R. & LONSANE, B. K. (1989). Microbial Production of Gibberellins: state of the art. *Advances in Applied Microbiology*, 34, 29-139.

LEKHA, P.K.; LONSANE, B.K. (1994). Comparative Titres, Location and Properties of Tannin Acyl Hydrolase Produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in Solid-State, Liquid Surface and Submerged Fermentations. *Process Biochemistry*, 29: 497-503

LESLIE J.F., SUMMERELL B.A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Illustrated by Suzanne Bullock. Ed. Blackwell Publishing. Iowa, U.S.A. First edition.

LIN, J-T.; STANFFORD, A.E.; STEFFENS, G.; MUROFUSHI, N. (1991). Gradient C18 high-performance liquid chromatography of gibberellins. *Journal of Chromatography*, 543:471–74.

LU, Z.-X.; XIE, Z.-C.; KUMAKURA, M. (1995). Production of Gibberellic Acid in *Gibberella fujikuroi* Adhered onto Polymeric Fibrous Carriers. *Process Biotechnology*, vol. 30, nº 7; p. 661-665.

LUDFORD, P.M. (2003). Hormonal changes during postharvest, In: Bredt J, Bartz J (Eds), *Postharvest Physiology and pathology of Vegetables*. Marcel Dekker. New York, 31–77.

MA, Z.; GE, L.; LEE, A.S.Y.; YONG, J.W.H.; TAN, S.N.; ONG, E.S. (2008). Simultaneous analysis of different classes of phytohormones in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using highperformance liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction. *Analytica Chimica ACTA*, 610:274-281.

MACHADO, C. M. M. (2000). Produção de ácido giberélico por fermentação no estado sólido em bioresíduos da agroindústria do café. Curitiba, Dissertação

(Mestrado em Tecnologia Química) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

MACHADO, C.M.M.; OLIVEIRA, B.H.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. (2001). Coffee husk as substrate for the production of gibberellic acid by fermentation. Em: Book on Coffee Biotechnology and Quality, SERA, T; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A.; ROUSSOS, S. (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 401–408.

MACHADO C.M.M. (2002). Desenvolvimento de bioprocesso para produção de hormônio vegetal (ácido giberélico – GA3) por fermentação no estado sólido em resíduos agroindustriais brasileiros: relação da produção de GA3 em biorreator piloto e bioensaios em mudas de tomateiro (*Lycopersicum esculentum*). Tese de doutorado em Processos Biotecnológicos - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

MACHADO, C. M. M, SOCCOL, C. R AND PANDEY, A. (2002), Gibberellic acid production by solid state fermentation in coffee husk. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 102, 179-192.

MACMILLAN, J. (2002). Occurrence of Gibberellins in Vascular Plants, Fungi and Bacteria. *Journal Plant Growth Regul*, 20: 387-442.

MADDOX, I.S.; RICHERT, S.H. (1977). Production of gibberellic-acid using a dairy waste as basal medium. *Applied and environmental microbiology*, 33:201–2.

MAJEAU, J.A.; BRAR, S.K.; TYAGI, R.D. (2010). Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresource Technology*, 101: 2331–2350.

MARQUES, M. O. (2006). Aspectos técnicos e legais da produção, transporte e aplicação de vinhaça. In: SEGATO, S. V. et al. (Org.). *Atualização em produção de cana-de-açúcar*. Piracicaba: CP 2, n. 6, p. 369-375.

MELEIGY, S.A.; KHALAF, M.A. (2009). Biosynthesis of gibberellic acid from milk permeate in repeated batch operation by a mutant *Fusarium moniliforme* cells immobilized on loofa sponge. *Bioresource Technology*, 100:374–379.

MESEJO C, MARTÍNEZ-FUENTES A, REIG C, AGUSTI M. (2008). Gibberellic acid impairs fertilization in Clementine mandarin under crosspollination conditions. *Plant Science*, 175:267–71.

METIVIER, J. R. (1979). Citoquininas e Giberelinas. In: FERRI, M. G. *Fisiologia Vegetal*, vol 2. São Paulo: E. P. U. EDUSP, p. 93-161.

MIGUEL, A.; MAROTO, J.V.; IRANZO, B.; LOEZ-GALARZA, S. (1997). Gibberellic acid in artichoke. *Horticultura, Revista de Hortalizas, Flores y Plantas Ornamentales*, 120:111–3.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Brasil projeções do agronegócio 2010/2011 a 2020/2021. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/PROJECOES%20DO%20AGRONEGOCIO%202010-11%20a%202020-21%20-%202_0.pdf. Acesso em 20 de janeiro de 2012.

MONSELISE, S.P.; HALEVY, A.H. (1964). Chemical inhibition and promotion of citrus bud induction. *Proceedings of the American Society of the Horticultural Science*, 84: 141–166.

MORENO-CASTILLA, C. (2004). Adsorption of organic molecules from aqueous solutions on carbon materials. *Carbon*, 42: 83-94.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE HDSB DATABASE. Disponível em: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+712>. Acesso em 29 de janeiro de 2012.

NELSON, N. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*, 153, 375-380.

NEMAT ALLA, M.M.; HASSAN, N.M. (1998). Efficacy of exogenous GA3 and herbicide safeners in protection of Zea mays from metolachlon toxicity. *Plant Physiol Biochem*, 36(11): 809-815.

O'NEIL, M.J. (2001). The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, ed 13, Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., p.785.

OLIVEIRA, B. G. (2010). Vinhaça da cana de açúcar: fluxos de gases de efeito estufa e comunidades de archea presente no sedimento do canal de distribuição. Dissertação Universidade de São Paulo.

ORTEGA-BAES, P.; ROJAS-ARÉCHIGA, M. (2007). Seed germination of *Trichocereus terscheckii* (Cactaceae): Light, temperature and gibberellic acid effects. *Journal of Arid Environments*, 69:169–76.

PAINTER, J.W.; STEMBRIDGE, G.E. (1972). Peach flowering response as related to time of gibberellin application. *Hort Science*, 7:389–390.

PANDEY, A. (1992). Recent developments in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 27:109–17.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; RODRIGUEZ-LEON, J.A.; NIGAN, P. (eds). (2001). *Solid State Fermentation in Biotechnology– Fundamentals and Applications*. Asiatech Publishers Inc., New Delhi, 221.

PANDEY, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13: 81–84.

PASSOS, I.R.S.; MATOS, G.V.C.; MELETTI, L.M.M.; SCOTT, M.D.S.; BERNACCI, L.C.; VIEIRA, M.A.R. (2004). Utilização do ácido giberélico para a quebra de dormência de sementes de *Passiflora nitida* Kunth germinadas in vitro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 26:380–381.

PASTRANA, L.M.; GONZÁLEZ, M.P.; TORRADO, A.; MURADO, M.A. (1995). A fedbatch culture model for improved production of gibberellic acid from a waste medium. *Biotechnology Letters*, 17: 263–8.

PEARCE, D.W.; KOSHIOKA, M.; PHARIS, R.P. (1994). Chromatography of gibberellins. *Journal of chromatography*, 658:91-122.

PESTICIDE REREGISTRATION STATUS. Disponível em: <http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/status.htm>. Acesso em 29 de janeiro de 2012.

PIO, T.F.; FRAGA, L.P.; MACEDO, G.A. (2008). Inoculum padronization for the production of cutinase by *fusarium oxysporum*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39:74-77

- QURESHI, N; LOLAS, A; BLASHEK, H. P. (2001). Soy molasses as fermentation substrate for production of butanol using *Clostridium beijerinckii* BA101. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 26: 290-295.
- RACHEV, R.C.; PAVLOV – ROUSEVA, R; BOJKOVA, S.V.; GANCHEVA, V.K. (1993). Isolation of gibberellic acid produced by *Fusarium moniliforme*. *Journal of Natural Products*, 56:1168-1170.
- RANGASWAMY V.; MUMBAI N.; BALU G. Process for gibberellic acid production with “*Fusarium moniliforme*” strains. United States Patent Application Publication. 2008, Apr. 10, n US 2008/0085543 A1.
- RODRIGUES, C.; VANDENBERGHE, L.P.S.; TEODORO, J.; OSS, J.F.; PANDEY, A.; SOCCOL C.R. (2009). A New Alternative to Produce Gibberellic Acid by Solid-State Fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*.
- RODRIGUES, C. (2010). Produção, extração e purificação de hormônio vegetal (ácido giberélico) por fermentação no estado sólido em polpa cítrica e utilização do extrato fermentado em meio de cultivo de bromélia in vitro. Tese de doutorado em Processos Biotecnológicos - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.
- RODRIGUES, C.; VANDENBERGHE, L. P. S.; OLIVEIRA, J.; SOCCOL, C. R. (2011). New perspectives of gibberellic acid production: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1–11.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. (2005). Planejamento de experimentos e otimização de processos - uma estratégia seqüencial de planejamento. 1ª Ed. Campinas –SP: Casa do Pão Editora.
- RODRIGUEZ COUTO, S., DOMINGUEZ, A., SANROMAN, A. (2001). Utilisation of lignocellulosic wastes for lignin peroxidase production by semi-solid-state cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biodegradation*, 12: 283–289.
- RODRIGUEZ-REINOSO, F.; MOLINA-SABIO, M. (1998). Textural and chemical characterization of microporous carbons. *Advances in Colloid and Interface Science*, 76-77: 271-294.
- ROEPCKE, C.B.S. (2007). Desenvolvimento de bioprocesso para produção de biomassa de levedura rica em zinco orgânico. Dissertação de mestrado em Processos Biotecnológicos - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.
- SAFRA CORRETORA DE CEREAIS. Disponível em: <http://safracorretoresdecereais.com.br/produtos.php>. Acesso em 5 de março de 2012.
- SANDBERG, G.; CROZIER, A.; ERNSTEN, A.; SUNBERG, B. (1987). HPLC and the analysis of indole-3-acetic acid and some of its decarboxylated catabolites in scots pine (*Pinus sylvestris* L.), in: Linskens HF, Jackson JF (Eds.), *Modern Methods of Plant Analysis: New Series- HPLC in Plant Sciences*, vol 5, Springer-Verlag, Germany.
- SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. São Paulo, 1985. 523p.
- SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (2001). *Biotecnologia Industrial*. São Paulo, Edgard Blücher Ltda, vol.2.

- SCHMIDT, C. M.; BELLE, R. A.; NARDI, C.; TOLEDO, K. DOS A. (2003). Ácido giberélico (GA3) no crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.) de corte "viking": cultivo verão/outono. *Ciência Rural*, 33: 267-274.
- SCHRADER, W.L. (1994). Growth regulator gives earlier harvest in artichokes. *California Agriculture*, 48: 29-32.
- SERCILOTO, C.M.; CASTRO, P.R.C. (2001). Use of Bioregulators on 'Tahiti' Lime (*Citrus Latifolia* Tanaka). *Laranja, Cordeirópolis*, 22: 383-394.
- SHARMA, R.R.; SINGH, R. (2009). Gibberellic acid influences the production of malformed and button berries, and fruit yield and quality in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Scientia Horticulturae*, 119: 430-433.
- SHUKLA, R.; SRIVASTAVA, A.K.; CHAND, S. (2003). Bioprocess strategies and recovery processes in gibberellic acid fermentation. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 8: 269-278.
- SHUKLA, R.; CHAND, S.; SRIVASTAVA, A. K. (2005). Improvement of gibberellic acid production using a model based fed-batch cultivation of *Gibberella fujikuroi*. *Process Biochemistry*, 40: 2045-2050.
- SILVA, M. A. S.; GRIEBELER, N.P.; BORGES, L. C. (2007). Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 11.
- SINGHANIA, R.R.; PATEL, A.K.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 44: 13-18.
- SOCCOL, C. R. (1994). Contribuição ao estudo da fermentação sólida em relação a produção de ácido fórmico, biotransformação de resíduo sólido de mandioca por *Rhizopus* e basidiomicetos do genero *Pleurotus*. Curitiba. Tese (Professor Titular em Biotecnologia e Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.
- SOCCOL, C.R. (1996). Biotechnological products from cassava roots by solid-state fermentation. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 55:358- 64.
- SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. (2003). Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*, 3648: 1-14.
- SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S.; RODRIGUES, C.; PANDEY, A. (2006). New Perspectives for Citric Acid Production and Application. *Food Technology and Biotechnology*, 44:141-149.
- SOMOGYI, M. (1937). A reagent for the copper-iodometric determination of very small amounts of sugar. *Journal of Biological Chemistry*, 117:771-776
- SOUTHWICK, S.M.; YEAGER, J.T.; ZHOU, H. (1995). Flowering and fruiting in 'Patterson' apricot (*Prunus armeniaca*) in response to postharvest application of gibberellic acid. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 94: 492-495.
- STEPHAN, M.; BANGERTH, F.; SCHNEIDER, G. (1999). Quantification of endogenous gibberellins in exudates from fruits of *Malus domestica*. *Plant Growth Regul*, 28: 55-58.

STODOLA, F.H.; RAPER, K.B.; FERMELI, D.L.; CONWAY, H.F.; JOHNS, V.E.; LANGFORD, C.T.; JACKSON, R.W. (1955). Microbiological production of gibberellins A and X. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 54: 240–245.

TAKAHASHI, Y. (1986). *Chemistry of plant hormones*. Boca Raton: CRC Press, 277p.

TAYLOR, B.H.; GEISLER-TAYLOR, D. (1998). Flower bud thinning and winter survival of 'Redhaven' and 'Cresthaven' peach in response to GA3 sprays. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123:500–508.

TAYLOR, D.R.; BLAKE, P.S.; CRISP, C.M. (2000). Identification of gibberellins in leaf exudates of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Plant Growth Regul*, 30: 221–223.

THE NCBI TAXONOMY. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=405761&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>. Acesso em: 20 de janeiro de 2012.

TOMASINI, A.; FAJARDO, C.; BARRIOS-GONZÁLEZ, J. (1997). Gibberellic acid production using different solid-state fermentation systems. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 13: 203–6.

TUCKER G.A., ROBERTS J.A. (Eds.) (2000). *Plant Hormone Protocols*, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 50

TUDZYNSKI, B. (1999) Biosynthesis of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*: biomolecular aspects. *Applied Microbiology Biotechnology*, 52: 298–310.

UNIÃO FARELOS - Disponível em: <http://www.uniaofarelos.com.br/polpa_citrica.html>. Acesso em: 5 de fevereiro de 2012.

UTHANDI, S.; KARTHIKEYAN, S.; SABARINATHAN, K.G. (2010). Gibberellic acid production by *Fusarium fujikuroi* SG2. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 69: 211–214.

WEBB, C.; KAMAT, S.P. (1993). Improving fermentation consistency through better inoculum preparation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9:308–312.

YAMAGUCHI, S. (2008). Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu. Rev. PlantBiol*, 59: 225–251.

ZAKI, E.M.; ABED, T.A.; GABAL, M.R.; EL-ABAGY, M.M. (1991). Effect of some growth regulators on growth, yield and phenolic substances of artichoke plants *Cynara scolymus* L. *Annals of Agric. Science, Moshtohor*, 26: 1939–57.